

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

KESIANE MAYRA DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DO POLÍMERO POLIPIRROL
UTILIZANDO ZEBRAFISH (*Danio Rerio*) COMO ORGANISMO MODELO**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DO
POLÍMERO POLIPIRROL UTILIZANDO
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO ORGANISMO MODELO

KESIANE MAYRA DA COSTA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina e Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Orientador:

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Co-orientadora:

Dra. Talita Carneiro Brandão Pereira

Porto Alegre
2019

Ficha Catalográfica

C837a Costa, Kesiane Mayra da

Avaliação da biocompatibilidade do polímero polipirrol utilizando zebrafish (Danio rerio) como organismo modelo / Kesiane Mayra da Costa . – 2019.

112 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo.

Co-orientador: Prof. Dr. Talita Carneiro Brandão Pereira.

1. PPy. 2. PPy/p-TSA. 3. Nanomateriais. 4. Nanotoxicidade. 5. zebrafish. I. Bogo, Maurício Reis. II. Pereira, Talita Carneiro Brandão. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

KESIANE MAYRA DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DO
POLÍMERO POLIPIRROL UTILIZANDO
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO ORGANISMO MODELO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Doutora em Medicina e
Ciências da Saúde pela Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
Área de concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Carla Denise Bonan

Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Profa. Dra. Patrícia Fernanda Schuck

Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone - Suplente

**Porto Alegre
2019**

Dedico esta conquista aos meus maiores incentivadores,

meus pais Rudemar e Lisete.

Muito obrigada por tudo, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao mestre orientador Maurício Reis Bogo, meu sincero agradecimento pelo carinho, amizade e confiança. Obrigada pela acolhida ainda no Mestrado e, desde lá, confiar plenamente no meu trabalho e na minha capacidade. Agradeço pela liberdade incondicional na bancada, pelos ensinamentos e questionamentos. Muito obrigada!

À mestre co-orientadora, colega e amiga Talita Carneiro Brandão Pereira, obrigada pelo coleguismo, carinho, ensinamentos e principalmente pelos questionamentos, mas sobretudo pela amizade, pois como sempre te disse: melhor do que ter uma “co” é ter uma “co” amiga! Te levarei para sempre no coração!

À Profa. Nara Regina de Sousa Basso, obrigada pela confiança e ensinamentos durante nossa colaboração. Agradeço por abrir as portas do Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) e assim, me oportunizando a aprender as maravilhas do mundo da Química.

À minha “personal química”, companheira e amiga Cristhiane Alvim Valente, o meu sincero agradecimento. Obrigada por sempre estar ao meu lado durante estes quatro anos de Doutorado e nunca ter questionado nenhum pedido, seja na síntese de um novo lote ou nas dúvidas. Este trabalho é tanto meu quanto teu, sem você nada disso teria acontecido.

“Carol” Ordovás e “Will” Lautert, meus queridos alunos de iniciação científica “compartilhados”, agradeço pelo zelo e comprometimento que tiveram com meu trabalho. Obrigada por me ensinarem a delegar funções e a compartilhar responsabilidades, algo antes nunca pensado por mim, tenham certeza que aprendi muito com vocês. Vocês são muito especiais.

Aos Profs. Sandro Bonatto e Eduardo Eizirik, obrigada pela acolhida e gentileza em poder utilizar um laboratório compartilhado com vocês e seus alunos.

Aos colegas “Genômicos” do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, muito obrigada pela parceria, pelos cafés e risadas, os dias no “lab” junto de vocês foram, sem dúvidas, os mais divertidos. Foi maravilhoso dividir o laboratório com vocês e aprender entre tantos Biólogos.

Aos colaboradores, Prof. Pablo Machado e a Dra. Kênia Pissinate, obrigada pela ajuda excepcional durante as análises e por gentilmente permitirem meu trabalho no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT).

À Profa. Fernanda Bueno Morrone e aos colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Cultura Celular, obrigada pela confiança em poder utilizar incondicionalmente o espaço do laboratório.

À Profa. Maria Martha Campos e aos colegas do Instituto de Toxicologia e Farmacologia, agradeço pela gentileza e auxílio toda vez que precisei, muito obrigada.

Agradeço aos professores e colegas do ZEBLAB por gentilmente permitirem que eu desempenhasse meu trabalho em vossas dependências e por me auxiliarem toda vez que precisei de ajuda. Especialmente agradeço ao colega Fabiano Peres Menezes por toda a ajuda técnica.

Aos técnicos Wagner Prates e Moema Queiroz Vieira do Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM), muito obrigada pela ajuda técnica.

Aos laboratoristas Fernando de Conto Hesler, Luciane Müncheen e Paulo Roberto Hendler do almoxarifado da Química, agradeço pela ajuda técnica nestes quatro anos.

As minhas queridas Helena Fetter Filippini, Fernanda Fernandes Cruz, Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira, Natália Nicolleti, Natália Pradella Cignachi, Lilian de Souza Teodoro, Ana Letícia Vargas Barcelos e Jéssica Cavalheiro Soares, vocês são, sem dúvidas, os presentes que o Doutorado me proporcionou. Ao lado de vocês os dias foram mais leves, coloridos e divertidos, seja na bancada ou durante os cafés. Obrigada pelo ombro amigo e pelos desabafos sinceros.

Aos meus pais, Rudemar e Lisete Ana da Costa, obrigada por acreditarem no meu sonho e sempre, incondicionalmente, me apoiarem em todas as decisões e encorajarem a sempre seguir em frente. Vocês são os meus exemplos de vida e de caráter, meu porto seguro e minha liberdade, obrigada pai e mãe, amo vocês!

Ao meu irmão Cristian Eduardo da Costa, como é bom ter ao meu lado a parte “razão” da família, pois tua garra e firmeza sempre refletiram em mim como forma de certeza, de que eu sempre alcançaria meus objetivos e sonhos. Te amo, mano!

Ao meu noivo, companheiro e amigo, Alexandre Telles, obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando. O teu carinho e compreensão me fizeram forte para ter a segurança e coragem que precisei para chegar até aqui. Divido contigo esta conquista, meu amor!

À minha dinda Mari, tio Jorge e meu primo Lucas Kich Grün, obrigada por sempre terem me acolhido em sua morada e nunca terem medido esforços para que eu me sentisse como se estivesse na minha casa. Obrigada por terem sido mãe, pai e irmão toda vez que precisei, sem o apoio de vocês eu nunca teria chegado até aqui. Obrigada por tudo, amo vocês!

À CAPES, CNPq, FINEP e PUCRS agradeço pelo financiamento ao longo destes quatro anos.

“...Um tempo em que aprendi a entender as coisas do mar, a conversar com as grandes ondas e não discutir com o mau tempo. A transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, aonde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, querer”.

Amyr Klink

RESUMO

O polímero polipirrol (PPy) tem sido pesquisado na área da nanomedicina por se tratar de um nanobiomaterial “inteligente”, devido a característica de estímulo-resposta e portanto, pode ser utilizado na reparação de tecidos, na produção de implantes neurais e também, em sistemas de entrega de drogas. Embora a nanotecnologia tenha se tornado uma ferramenta interessante e útil nas ciências da saúde, cabe ressaltar que as nanopartículas podem exercer efeitos tóxicos tanto no organismo quanto no meio ambiente. Por esta razão são necessárias mais pesquisas na área da nanotoxicologia aliadas a *screenings* toxicológicos de alto rendimento. Neste cenário, o *zebrafish* surge como um modelo animal capaz de refinar algumas respostas que ainda carecem de entendimentos mais profundos e acurados a respeito do potencial toxicológico dos nanomateriais. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de PPy (dopado com ácido *p*-toluenosulfônico; PPy/*p*-TSA), assim como avaliar os efeitos deste nanomaterial em diferentes concentrações (25, 100, 250 e 500 µg/mL) sobre os parâmetros morfológicos, funcionais, comportamentais, bioquímicos e moleculares de embriões e larvas de *zebrafish* após três e seis dias de exposição. Os dados obtidos indicam que a síntese dos dois lotes de PPy/*p*-TSA apresentaram partículas em escala nano, sendo que as menores partículas variaram em 23 nm (lote 1) e 63 nm (lote 2). Em relação à caracterização da dispersibilidade do particulado em 1% de PF68, foi possível constatar que as dispersões alcançaram suas estabilidades de decantação em 12 h (lote 1) e 18 h (lote 2), a partir de uma avaliação total de 24 h. O PPy/*p*-TSA não acarretou em mortalidade significativa aos grupos expostos, mas em contrapartida, promoveu uma aceleração na eclosão de forma dose-dependente, principalmente em 48 horas pós-fertilização (hpf). Análises realizadas por microscopia ótica e por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo mostraram que o PPy/*p*-TSA apresentou afinidade pelo tecido biológico através de significativa deposição de partículas no córion dos embriões. No que se refere aos dados morfológicos, foi possível verificar que os animais expostos as diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA apresentaram alterações no comprimento corporal, bem como na distância ocular. Além disso, os animais expostos a altas concentrações do particulado apresentaram consistente diminuição nos parâmetros locomotores. Para compreender o possível envolvimento inflamatório causado pelas nanopartículas *in vivo*, o ensaio com o marcador para laranja de acridina evidenciou marcações sugestivas de morte celular na porção caudal dos animais expostos. Contudo, a atividade neutrofílica da mieloperoxidase não

apresentou alteração nos grupos de 25, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de PPy/*p*-TSA, somente o grupo com a maior concentração apresentou atividade neutrofílica diminuída em relação aos grupos controles. Ademais, os parâmetros bioquímicos para estresse oxidativo mostraram aumento da atividade da CAT em todos os grupos expostos, incluindo o veículo. Por outro lado, o conteúdo da GSH nos grupos de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ de PPy/*p*-TSA apresentou-se diminuído em relação ao grupo veículo. A análise da expressão gênica relativa para marcadores de estresse oxidativo mostrou alteração principalmente dos grupos expostos em relação ao grupo veículo. Em conjunto, os dados do presente estudo sugerem que as nanopartículas de PPy/*p*-TSA podem exercer efeitos adversos no desenvolvimento, no comportamento e em parâmetros bioquímicos e moleculares do *zebrafish*, ressaltando a necessidade de refinar o entendimento da toxicidade deste nanomaterial.

ABSTRACT

The polymer polypyrrole (PPy) has been of great interest in nanomedicine as a smart nanobiomaterial due to stimulus-response characteristics that are useful for tissue regeneration, neural implants and drug delivery systems. Although PPy has become a suitable tool for health sciences, nanoparticles might exert toxic effects in organisms and environment and, consequently, nanotoxicological approaches and toxicological screenings are needed to ensure their safety. Under this scenario, zebrafish emerges as a useful model organism to refine and deepen understanding of potential toxicological effects of nanomaterials. The current work aimed to synthesize and characterize PPy nanoparticles (doped with *p*-toluenesulfonic acid; PPy/*p*-TSA) and to evaluate the effects of 3- and 6-day exposure to different concentrations (25, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ of PPy/*p*-TSA) on morphological, functional, behavioral, biochemical and molecular parameters *in vivo*, using zebrafish embryo and larva as model organism. Data show that both synthesis lot were able to produce PPy/*p*-TSA particles with nanoscale size and suspensions, performed in 1% PF68, were able to reach stability with 12-18h. Exposure to PPy/*p*-TSA suspension did not alter animals' survival, however, it promoted early hatching, in a dose-dependent manner. Electronic microscopy analysis showed PPy/*p*-TSA particles affinity to biological tissue, with significant dose-dependent envelopment of embryo chorion. Morphological data showed significant changes in body length and ocular distance, especially in higher doses, which also presented changes in behavioral parameters compatible with animals hypoactivity. Therefore, results emphasize adverse effects of PPy/*p*-TSA exposures on development and behavior. To understand the potential underlying mechanisms contributing to the scenario, markers of inflammation, oxidative stress and cellular death were also evaluated. Myeloperoxidase activity, as an inflammatory marker, showed no alterations, except for reduction in the group with highest dose of PPy/*p*-TSA. Acridine orange staining indicated consistent cellular death in neuromasts and tail region exclusively in animals exposed to PPy/*p*-TSA. Oxidative stress markers were also found to be altered in terms of gene expression and/or protein activity. Activity of catalase and glutathione reductase content, for example, were, respectively, increased and reduced among exposed groups. Taken together, data indicate that PPy/*p*-TSA exposure induces oxidative stress responses that might led to cellular death. Additional markers of oxidative stress and cellular death will be investigated to broaden the analysis and

robustly address these preliminary findings; aiming, more importantly, to highlight and refine previously unknown adverse effects that PPy exposure might exert *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química.

Figura 2 – Mecanismo de polimerização oxidativa e produto final do PPy.

Figura 3 – Particulado de PPy e a fagocitose das nanopartículas.

Figura 4 – Cultura celular de linhagem PC-12 com PPy.

Figura 5 – Diagrama esquemático de diferentes rotas de exposição às nanopartículas.

Figura 6 – Síntese do PPy/*p*-TSA.

Figura 7 – Protocolo de exposição.

Figura 8 – Caracterização do polímero seco, estabilidade e caracterização das suspensões de PPy/*p*-TSA.

Figura 9 – Curva de sobrevivência e taxa de eclosão dos animais expostos ao PPy/*p*-TSA.

Figura 10 – Marcação celular em larvas de *zebrafish* expostas ao PPy/*p*-TSA.

Figura 11 – Atividade da mieloperoxidase em larvas de *zebrafish* expostas ao PPy/*p*-TSA.

Figura 12 – Efeitos da exposição do PPy/*p*-TSA no estresse oxidativo.

Figura 13 – Expressão gênica de marcadores para estresse oxidativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* utilizados para avaliar a expressão gênica (RT-qPCR).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

p-TSA – ácido *para*-toluenosulfônico

APTS – ácido *p*-toluenosulfônico monohidratado

α – alfa

KBr – brometo de potássio

CAT – catalase

FeCl₃ – cloreto férrico

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DLS – do inglês: *Dynamic Light Scattering* - Espalhamento Dinâmico de Luz

EDS – do inglês: *Energy Dispersive X-ray Spectrometry* - Espectrometria de Raios Energia Dispersiva para Análise Elementar

UV-Vis – Espectroscopia UV-visível

FESEM – do inglês: *Field-Emission Scanning Electron Microscopy* - Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo

FET – do inglês: *Fish Embryo Acute Toxicity Test*

FTIR – do inglês: *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GI – gastro intestinal

GSH – glutationa redutase

hpf – horas pós-fertilização

IV – infravermelho

Fe³⁺ – íon férrico

MDA – malondialdeído

MPO – mieloperoxidase

NPs – nanopartículas

NO – do inglês: *Nitric Oxid* - Óxido Nítrico

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

Py – pirrol

PF68 – Pluronic[®] F-68

PEDOT – poli(3,4-etilenodioxitiofeno)

PANI – polianilina

PBD – polibutadieno

PEG – polietilenoglicol

PIP – poliisopreno

PPy – polipirrol

PPG – polipropilenoglicol

PPy/*p*-TSA – polipirrol dopado com ácido *p*-toluenosulfônico

PTh – politiofeno

PQC – pontos quânticos de carbono

RT-qPCR – do inglês: *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* - PCR em tempo real

RNS – do inglês: *Reactive Nitrogen Species* - Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS – do inglês: *Reactive Oxygen Species* - Espécies Reativas de Oxigênio

3rs – do inglês: *Reduction, Replacement, Refinement* - Redução, Substituição, Refinamento

REACH – do inglês: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TBARS – do inglês: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TEM – do inglês: *Transmission Electron Microscopy* - Microscopia Eletrônica de Transmissão

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Polímeros condutores: da descoberta ao uso como biomaterial	20
1.2. Polipirrol: característica, síntese e aplicabilidade.....	21
1.3. Polipirrol e nanomateriais à base de carbono como ferramentas na área biomédica	25
1.4. Nanotoxicidade do polipirrol e nanomateriais à base de carbono	30
1.5. <i>Zebrafish</i> como modelo animal em estudos de nanotoxicidade.....	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral	41
3.2. Objetivos Específicos	41
CAPÍTULO II	43
Manuscrito publicado no periódico <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i>	
“Adverse effects of <i>p</i> -TSA-doped polypyrrole particulate exposure during <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) development”	
CAPÍTULO III	64
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1. Síntese do PPy/ <i>p</i> -TSA	67
2.2. Caracterização do PPy/ <i>p</i> -TSA	68
2.3. Preparo das suspensões de PPy/ <i>p</i> -TSA	70
2.4. Caracterização das suspensões de PPy/ <i>p</i> -TSA.....	70
2.5. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	71
2.6. Análise Estatística	75

3. RESULTADOS PARCIAIS.....	76
3.1. Caracterização das partículas e estabilidade das suspensões de PPy/ <i>p</i> -TSA....	76
3.2. Efeitos da exposição do PPy/ <i>p</i> -TSA sobre o desenvolvimento embrionário	78
3.3. Marcação celular por laranja de acridina.....	79
3.4. Atividade da mieloperoxidase neutrofílica.....	81
3.5. Análise de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo.....	81
3.6. Análise da expressão gênica para estresse oxidativo.....	82
CAPÍTULO IV.....	85
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
2. PERSPECTIVAS.....	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	106
Anexo A.....	107
Anexo B.....	109

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

- 1.1. Polímeros condutores: da descoberta ao uso como biomaterial
- 1.2. Polipirrol: característica, síntese e aplicabilidade
- 1.3. Polipirrol e nanomateriais à base de carbono como ferramentas na área biomédica
- 1.4. Nanotoxicidade do pilipirrol e nanomateriais à base de carbono
- 1.5. *Zebrafish* como modelo animal em estudos de nanotoxicidade

2. JUSTIFICATIVA

3. OBJETIVOS

- 3.1. Objetivos Gerais
 - 3.2. Objetivos Específicos
-

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais e com a crescente evolução tecnológica na área da saúde, bem como a expectativa de vida aumentada, a emergência e reemergência de doenças, faz com que a medicina tenha a necessidade de se reinventar. Assim, têm voltado suas ações e esforços principalmente na prevenção, na manipulação e no controle das doenças, sejam por meio de alternativas químicas ou o uso de moléculas biológicas. Paralelamente, a engenharia de tecidos também tem se expandido, e esse avanço só se torna possível graças ao envolvimento multidisciplinar das áreas da saúde, da engenharia, da biologia e ciência dos materiais (Ikada, 2006; O'Brien, 2011). A engenharia de tecidos, através do uso de suportes naturais ou sintéticos, procura criar alternativas que sejam capazes de restabelecer e/ou recuperar a função de um órgão ou tecido lesado (Rodríguez-Vásques *et al.*, 2015).

Os biomateriais surgem, então, como uma nova alternativa terapêutica que busca proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente (Hartwell *et al.*, 2011; Pires & Pêgo, 2015; Mann *et al.*, 2018), desenvolvendo um papel importante na saúde humana, ao contribuir na restauração da funcionalidade de tecidos e órgãos lesados. Tais materiais podem ser constituídos por metais, cerâmicas, polímeros e materiais de origem natural. O campo de aplicação destes biomateriais é bastante amplo, com utilização na medicina cardíaca, ortopédica, oftálmica, passando pelo campo estético como cirurgias plásticas e também bariátrica e claro, na medicina reparativa tecidual (O'Brien, 2011; Pires & Pêgo, 2015).

1.1. Polímeros condutores: da descoberta ao uso como biomaterial

Os polímeros são macromoléculas de alta massa molar formadas pela ligação de unidades repetitivas menores (meros) ao longo da cadeia principal (Tian *et al.*, 2012). Por se tratar de um material versátil, com boa biocompatibilidade e flexibilidade estrutural, permite adaptar suas propriedades e características durante sua produção (Khan *et al.*, 2016; Teo *et al.*, 2016; Love, 2017; Weil & Barz, 2017). Os polímeros são muito visados para aplicações na indústria e na área biomédica, podendo ser classificados como biomateriais poliméricos naturais (colágenos, alginatos e quitosanas) e poliméricos sintéticos (divididos em biodegradáveis e não-biodegradáveis) (Khan *et al.*, 2016). O uso dos biomateriais poliméricos sintéticos é mais indicado devido a sua característica estrutural de cadeia longa ser mais

próxima à estrutura de proteínas e polissacarídeos dos tecidos naturais, o que resulta em uma melhor resposta biológica do tecido a ser recuperado (Love, 2017).

Os polímeros condutores intrínsecos têm se destacado no campo da investigação nos últimos tempos. O interesse pela sua composição química provém da procura de um material capaz de mesclar as propriedades elétricas e ópticas dos metais com a flexibilidade de processamento e facilidade de síntese dos polímeros convencionais (Ateh *et al.*, 2006a). Dados da literatura mostram que estes polímeros condutores intrínsecos apresentam compatibilidade com muitas moléculas biológicas, e por isso, se mostram atraentes para aplicações biomédicas (Guimard *et al.*, 2007; Ravichandran *et al.*, 2010). Suas aplicações incluem biosensores (dispositivos com biomoléculas como elementos sensores integrados com transdutores elétricos), bio-atuadores (músculos artificiais), sistemas de *drug delivery*, sondas neurais, estimulação de neurônios, regeneração de tecidos/órgãos, entre outras (Kotwal & Schmidt, 2001; Ateh *et al.*, 2006a; George *et al.*, 2006; Guimard *et al.*, 2007; Mirfakhrai *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2010; Ravichandran *et al.*, 2010; Alvarez-Mejia *et al.*, 2015; Nguyen & Yoon, 2016; Schirmer *et al.*, 2016).

Após a descoberta de que polímeros condutores intrínsecos poderiam influenciar na adesão e migração celular, a partir de suas características de estimulação elétrica, tem se expandido cada vez mais a aplicação destes biomateriais para fins biomédicos, visando futuramente sua introdução em processos terapêuticos (Rivers *et al.*, 2002). Atualmente, já existem mais de 25 tipos de polímeros condutores disponíveis. Entre os sistemas poliméricos condutores intrínsecos podemos citar o polipirrol (PPy); polianilina (PANI); polibutadieno (PBD); poliisopreno (PIP); politiofeno (PTh); poli (3,4- etilenodioxitiofeno) (PEDOT), entre tantos outros (Balint *et al.*, 2014). Sem dúvida existem evidências muito atrativas para o uso destes materiais na área da medicina regenerativa, e o PPy é um promissor candidato no campo biomédico (Park *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

1.2. Polipirrol: características, síntese e aplicabilidade

O PPy, é obtido a partir do monômero pirrol (Py) (Figura 1A, B) sendo um polímero condutor de grande interesse, pois possui como característica a estabilidade ambiental, propriedades térmicas e elétricas, e pode ser facilmente sintetizado por diferentes rotas de sínteses (Osmatová *et al.*, 2003; Ansari, 2006; Xia *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2013; Nguyen & Yoon, 2016). Tendo em vista estes atrativos, a sua aplicação em células combustíveis

(Chronakis *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006), proteção contra a corrosão (Castano *et al.*, 2004), telas para computadores, ferramentas microcirúrgicas (Lee *et al.*, 2006) e biosensores (Aoki *et al.*, 1996; Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2011), são de grande interesse para a indústria. Além disso, também apresenta boa biocompatibilidade com tecidos biológicos e por isso, tem se destacado como candidato para aplicações na área da medicina (Ateh *et al.*, 2006a; Balint *et al.*, 2014).

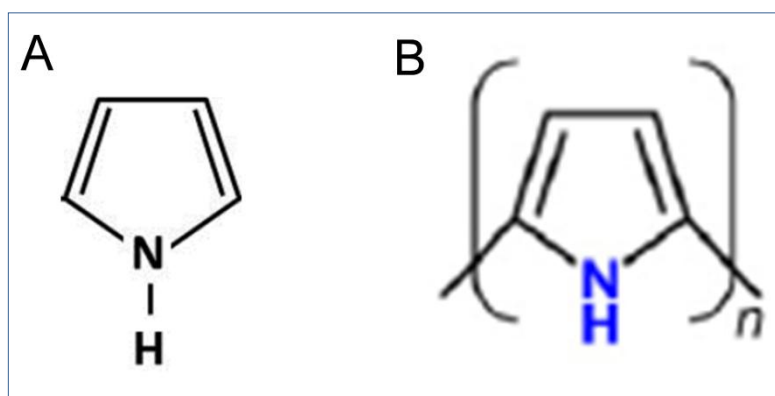


Figura 1. Estrutura química. Estrutura química do pirrol (A) e do polipirrol (B). Adaptado de Balint *et al.*, 2014.

A capacidade de condutância elétrica do polímero é decorrente de sua cadeia polimérica que apresenta uma estrutura constituída por uma alternância de ligações simples e duplas (conjugação) entre os átomos de carbono ao longo de sua cadeia. Este tipo de arranjo químico oferece um caminho para o fluxo de elétrons que são responsáveis pela característica de condução elétrica. Além das ligações duplas conjugadas, a condutância do polímero também se dá através da perturbação química por meio da remoção de seus elétrons (oxidação) e por meio de inserção de elétrons (redução) (Balint *et al.*, 2014).

Embora os polímeros condutores em geral possam ser obtidos eletro e quimicamente, o primeiro polímero condutor a ser sintetizado eletroquimicamente foi o PPy. A eletropolimerização é a técnica mais utilizada para obtenção de produtos com valores mais elevados de condutividade elétrica (Tkach *et al.*, 2013). No entanto, entre as diversas metodologias de obtenção do polímero, a síntese por rota química é a melhor opção de escolha quando grandes quantidades do produto são requeridas, além da facilidade de se obter variados polímeros condutores através da intercalação do íon dopante ao longo da estrutura do polímero, durante o processo de polimerização (Xia *et al.*, 2011). O PPy pode ser sintetizado

facilmente pelo método de oxidação química do monômero Py em grandes quantidades e em temperatura ambiente utilizando uma ampla gama de solventes (Cui *et al.*, 2001; Bousalem *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Chronakis *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). Sua obtenção envolve a polimerização química do Py através da oxidação do monômero com cátions de metais, como por exemplo, íon férrico (Fe^{3+}) proveniente de sais de nitrato de ferro dissolvido em solução aquosa. Usualmente, a reação ocorre na água, onde o potencial redox típico do Fe^{3+} é capaz de servir como um iniciador e a síntese procede quase exclusivamente através do ataque da posição alfa (α) dos cinco membros do anel do Py (Figura 2A). A reação tem como produto final o PPy, que consiste em um pó de coloração preta (Figura 2B) e de característica insolúvel (tanto em diluentes orgânicos quanto em água) devido ao *crosslinking* de suas cadeias poliméricas (Dallas & Georgakilas, 2015).

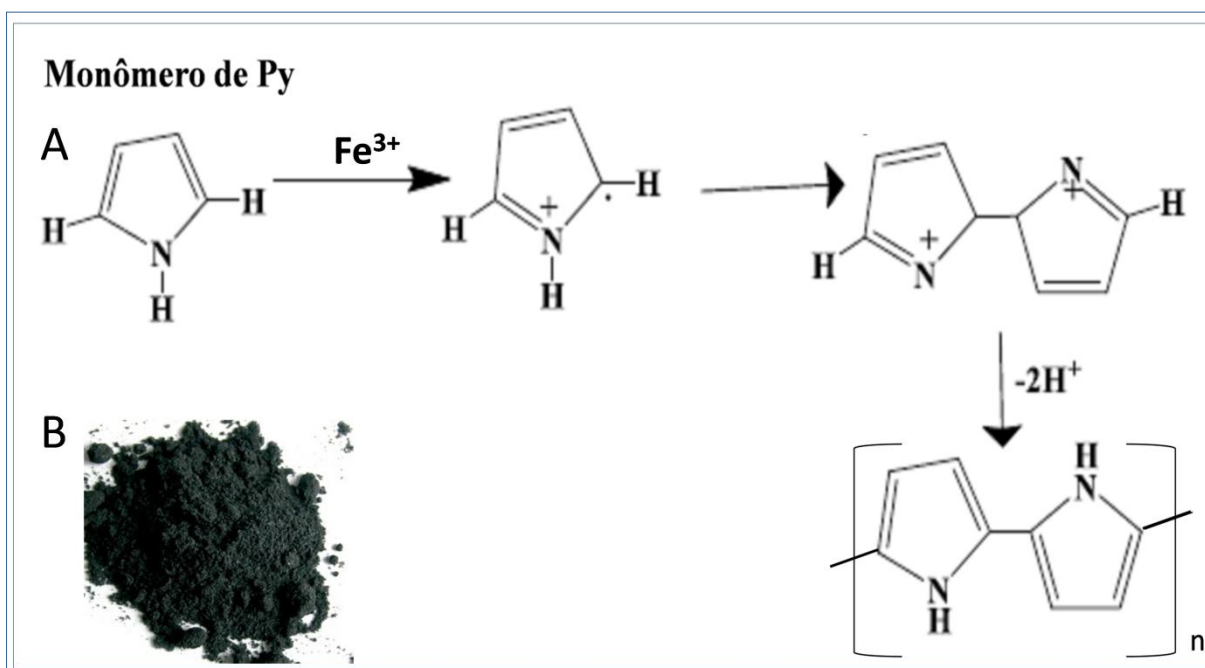


Figura 2. Mecanismo de polimerização oxidativa e produto final do PPy. Diagrama da reação de oxidação de Fe^{3+} atacando o anel de Py na posição α , onde a reação se propaga através de subsequente adição de moléculas de Py formando o PPy (A). Característica final do pó do particulado de PPy após a síntese (B). Adaptado de Dallas & Georgakilas, 2015.

O PPy pode ser sintetizado com uma ampla área de superfície e possuir porosidade, além de ser facilmente modificado durante a síntese visando a adaptação às aplicações biomédicas, por exemplo, através da incorporação de moléculas bioativas na sua estrutura final (Cui *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006; Gomez & Schmidt, 2007; Kim *et al.*, 2007; Akkouch

et al., 2010). Uma vez que o polímero é sintetizado, é difícil realizar modificações no PPy (Bousalem *et al.*, 2003; 2004; Zhang *et al.*, 2007; Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2011), pois sua estrutura molecular o faz um material não termoplástico (Bousalem *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2008), de rigidez mecânica (Brahim & Guiseppi-Elie, 2005; Meng *et al.*, 2008; Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2011) e insolúvel após sua síntese (Lee *et al.*, 2006). A insolubilidade de nanomateriais à base de carbono em meio aquoso já foi descrita em estudos prévios (Cho *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2017) e a alternativa para essa questão hidrofóbica é a utilização de surfactantes para a dispersibilidade destes materiais (Pan *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2018). O PPy pode, no entanto, ser dopado com pequenas moléculas de ânions no processo de síntese, sendo os ânions determinantes para as propriedades físicas e químicas deste polímero condutor (Thompson *et al.*, 2011). Os dopantes também contribuem para a atividade biológica do polímero e colaboram para otimizar a interação deste com células específicas, pois tratam-se na maioria dos casos, de dopantes biocompatíveis (Bendrea *et al.*, 2011; Lundin *et al.*, 2011). Estudos prévios demonstram que o ácido *para*-toluenossulfônico (*p*-TSA), considerado um ânion surfactante sintético, pode ser inserido durante a polimerização oxidativa do PPy como dopante biocompatível (Thompson *et al.*, 2011; Fahlgren *et al.*, 2015).

O polímero PPy possui capacidade de estímulo-resposta quando *in vitro* ou mesmo na aplicação de enxertos *in vivo*, que faz deste material um promissor biomaterial ‘inteligente’ (Garner *et al.*, 1999a; b; Li *et al.*, 2004; George *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2008; Ferraz *et al.*, 2012). Entre outras características está a boa estabilidade química (quando exposto ao ar e a água) (Bousalem *et al.*, 2004; Cetiner *et al.*, 2010) e considerável condutividade elétrica quando em meio fisiológico (Li *et al.*, 2004; Zhang & Manohar, 2004; Kim *et al.*, 2007; Akkouch *et al.*, 2010; Ferraz *et al.*, 2012). Tais características permitem o uso do PPy em várias aplicações na área da saúde em sistemas de entrega de drogas (Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2012), como biomaterial para a engenharia tecidual (Bettinger *et al.*, 2009), sondas neurais (Gomez *et al.*, 2007), suportes para regeneração de tecidos (Gomez *et al.*, 2007; George *et al.*, 2005) e condutos sanguíneos (Alikacem *et al.*, 1999).

1.3. Polipirrol e nanomateriais à base de carbono como ferramentas na área biomédica

O desenvolvimento de novos materiais funcionais em escala nano vem sendo impulsionado pelos avanços tecnológicos em nanociência e nanotecnologia, possibilitando a obtenção de materiais de alto desempenho. O desenvolvimento de compostos poliméricos com adequada microestrutura e propriedades elétricas para aplicação nas mais variadas áreas médicas e tecnológicas ainda é um grande desafio (Muller *et al.*, 2011). A síntese de materiais em escala nanométrica com estrutura e funcionalidade controladas têm tornado possível avanços na produção de nanomateriais (Oh *et al.*, 2010). As nanopartículas (NPs) são uma classe de materiais com tamanhos que podem variar geralmente entre 1 a 100 nm, e que estão emergindo como uma atrativa ferramenta para o uso nas diversas áreas da medicina, sejam elas regenerativa, de diagnóstico ou para entrega de drogas (Hahn *et al.*, 2011). Em resposta a sua ampla área de superfície em relação ao seu tamanho pequeno, estes nanomateriais são propícios para armazenamento de biomoléculas em sistemas de tamanho reduzido e sensibilidade aumentada (Tian *et al.*, 2012).

O uso de nanomateriais na medicina regenerativa se dá através da produção de *scaffolds* (traduzido do inglês como: suportes, estruturas, arcabouços), que podem ter a capacidade de mimetizar as propriedades do tecido que foi lesado, favorecendo a regeneração, o reparo bem como sua substituição. Vários produtos para esta finalidade, à base de nanomateriais, já estão disponíveis no mercado comercial internacional. Anualmente, nos Estados Unidos, a compra destes produtos para cuidados do tipo *healthcare* chegam à cifra de 150 bilhões de dólares contabilizados em mais de 200.000 unidades vendidas comercialmente (Johnson *et al.*, 2015).

O desenho apropriado de um *scaffold* destinado à reparação de um dano tecidual deve levar em consideração as propriedades físicas, químicas e mecânicas de cada tecido alvo, considerando a escolha do biomaterial utilizado, as células envolvidas e o tipo de estímulo bioquímico e/ou mecânico (Sensharma *et al.*, 2017). Neste cenário, a biocompatibilidade de um nanomaterial é uma característica de grande importância, pois facilita a adesão celular, propiciando, assim, a migração e proliferação (O'Brien, 2011). As propriedades de adesão celular dependem das características da superfície do material, tais como densidade de carga e umectação (Subramanian *et al.*, 2009). No entanto, juntamente com a biocompatibilidade de nanomateriais, os perfis de toxicidade também desenvolvem um papel crucial na manutenção celular (Patel *et al.*, 2011).

Diversos estudos já demonstraram a biocompatibilidade *in vitro* do PPy e de outros nanomateriais à base de carbono. Pesquisas anteriores utilizaram o polímero PPy como suporte para a manutenção, proliferação e diferenciação de células endoteliais, osteoblastos, queratinócitos, células do músculo esquelético, células neuronais e células de feocromocitoma de ratos (Schmidt *et al.*, 1997; Garner *et al.*, 1999a; De Giglio *et al.*, 2000; Lakard *et al.*, 2004; Stauffer & Cui, 2006; Ateh *et al.*, 2006b; Gilmore *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Materiais como o grafeno também têm sido pesquisados com o objetivo de melhorar a viabilidade e crescimento de neuritos (Tu *et al.*, 2013), bem como a interface neural para a engenharia tecidual (Tang *et al.*, 2013). O grafeno serve ainda como uma plataforma para a manutenção celular de células tronco neuronais (Yang *et al.*, 2016). Em relação a aplicações *in vivo*, já foram descritos implantes de PPy para o auxílio da regeneração do músculo, nervo periférico e tecido da hipoderme de ratos (Williams & Doherty, 1994; Jiang *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004a). Williams e Doherty (1994) demonstraram que filmes de PPy são citocompatíveis *in vitro* e *in vivo* quando expostos a células de neuroblastoma e fibroblastos de camundongos, demonstrando assim, a otimização no tempo de crescimento e viabilidade destas células quando em contato com o polímero (Williams & Doherty, 1994).

A biodegradabilidade é justamente uma das maiores vantagens de nanomateriais biodegradáveis, pois estes implantes não precisam ser retirados cirurgicamente após o reparo de uma lesão, podendo ser absorvidos pelos tecidos adjacentes (Patel *et al.*, 2011). Como o PPy é um polímero de característica não-biodegradável, alguns estudos avaliaram a influência das NPs do polímero (Figura 3A) *in vivo*, frente ao sistema imune e hematológico de murinos (Figura 3B). Os resultados demonstraram que não houve indução de sintomas relacionados a reações alérgicas, uma vez que a contagem de eosinófilos se manteve igual ao grupo controle, e aparentemente nenhuma citotoxicidade foi detectada como resultado das partículas de PPy injetadas na região peritoneal (Ramanaviciene *et al.*, 2007).

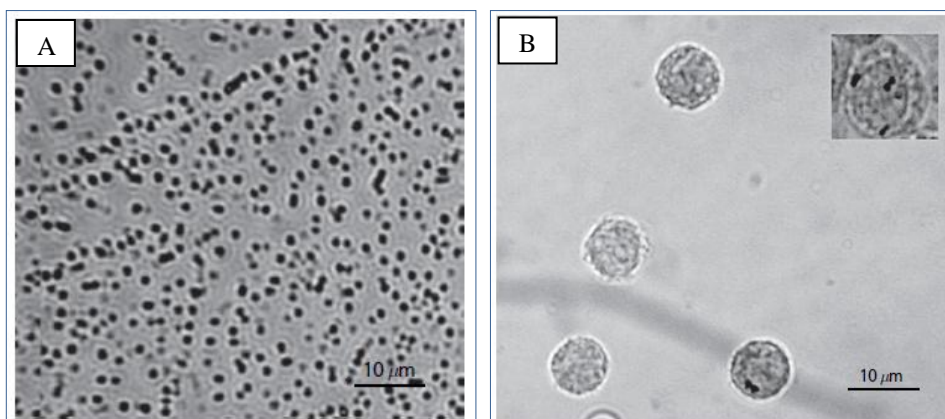


Figura 3. Particulado de PPy e a fagocitose das nanopartículas. Imagens de partículas de PPy sintetizadas (A) e o processo de fagocitose do polímero a partir de macrófagos peritoneais de camundongo (B). Adaptado de Ramanaviciene *et al.*, 2006.

Um suporte ideal deve possuir um formato anatômico apropriado bem como porosidade para que possa mimetizar o tecido a ser substituído. A adequada porosidade (cerca de 90% da superfície do material) e o tamanho do poro (100-500 μm) são essenciais para o crescimento celular, vascularização e difusão de fatores de crescimento e nutrientes no próprio nanomaterial e nos tecidos circundantes ao local lesado (O'Brien, 2011; Patel *et al.*, 2011). Em um estudo realizado por Wang e colaboradores (2004), a recuperação da lesão provocada no nervo ciático de ratos foi otimizada naqueles com implante de tubos de silicone contendo PPy, ao contrário do que foi verificado em animais somente com implante de tubos de silicone sem o polímero (Wang *et al.*, 2004a). Da mesma forma, George e colaboradores (2009) observaram que a regeneração axonal e a mielinização do nervo ciático de ratos após o implante de nanotubos contendo PPy mostrou maior êxito. Principalmente porque o polímero apresenta considerável atividade eletroquímica, característica esta, que ajuda na otimização da regeneração (George *et al.*, 2009).

A técnica mais frequentemente utilizada para a produção de filmes de PPy em diferentes substratos é a eletropolimerização. A relação entre os parâmetros de síntese, propriedades poliméricas (hidrofilicidade e tipo de superfície) e compatibilidade do polímero foram avaliadas em um estudo sistemático correlacionando a metodologia para a síntese do PPy e os efeitos biológicos destas características nas células (Fonner *et al.*, 2008). Estas características são decisivas para o desempenho do polímero, pois estudos demonstraram que a característica da superfície, mais precisamente as de forma áspera, a escolha do dopante utilizado (grau de biocompatibilidade) e a espessura do filme de PPy produzido, são fatores decisivos para uma

melhor adesão e manutenção celular (Bendrea *et al.*, 2011). Contudo, um suporte também deve possuir propriedades mecânicas idênticas ao tecido a ser substituído. Caso esta característica não seja encontrada no biomaterial, materiais com propriedades mecânicas que podem proteger as células frente a forças de tensão e compressão devem ser adotados (Patel *et al.*, 2011). Nanofibras poliméricas são vantajosas em relação a este aspecto, uma vez que possuem propriedades mecânicas únicas, como elasticidade, força de tensão e módulo de cisalhamento (O'Brien, 2011). Pesquisas prévias mostraram que o controle da direção e alinhamento do crescimento do neurito celular em células de linhagem PC-12 e neurônios hipocâmpais foram otimizadas quando cultivadas sobre nanofibras alinhadas de PPy (Liu *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

Além de todas as características desejáveis acima citadas, os nanomateriais ainda devem ser capazes de proporcionar de forma única ou combinada as atrativas e adequadas características mecânicas, bioquímicas, topográficas e/ou elétricas para cada aplicação. Estas características ajudam o suporte a mimetizar a matriz extracelular biológica do tecido *in vivo*, facilitando assim, a manutenção celular através do contato com o nanomaterial (Garner *et al.*, 1999a). A estimulação elétrica extra, obtida de acordo com o tipo de síntese ou mesmo com aplicação de potencial elétrico, a determinados polímeros tem sido avaliada em vários estudos por apresentarem excelentes resultados no sucesso regenerativo e na reconexão sináptica após lesões dos nervos periféricos (Forciniti *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). O estímulo elétrico extra tem demonstrado o aumento dos processos de regeneração nervosa quando combinado com o uso de nanomateriais como PPy e PANI (Schmidt *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2015).

Estudos utilizando protocolos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que membranas de PPy podem ser utilizadas para estimular o crescimento de fibroblastos (Shi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004a) e células de linhagem PC-12 (Figura 4) (Zhang *et al.*, 2007; 2015). Estes resultados são possíveis, pois a característica da condutividade elétrica do PPy aliada a própria estimulação nervosa consegue manter o benefício do estímulo elétrico por períodos mais longos, refletindo assim, no êxito da manutenção celular (Bendrea *et al.*, 2011). De acordo com as propriedades condutoras do PPy e a habilidade das nanofibras influenciarem o crescimento direcional dos neuritos (Corey *et al.*, 2007), foi observado um importante aumento do crescimento axonal e a migração de células de Schwann após o contato com o PPy (Quigley *et al.*, 2009; Forciniti *et al.*, 2014).

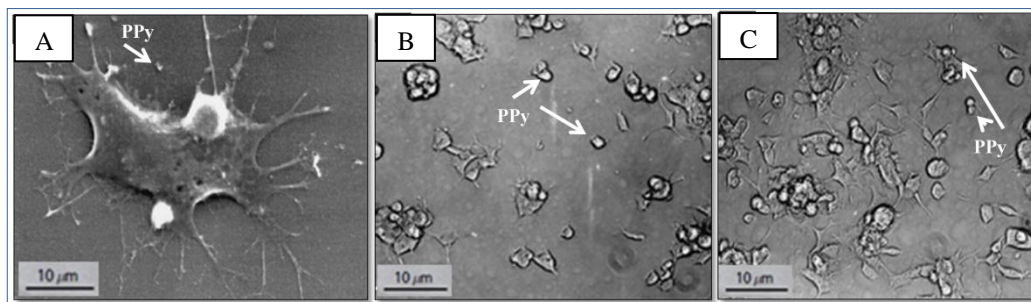


Figura 4. Cultura celular de linhagem PC-12 com PPy. Microscopia eletrônica de uma célula de linhagem PC-12 em meio de cultura contendo PPy (A). Diferenciação de células de linhagem PC-12 em meio contendo PPy sem potencial elétrico (B) e com aplicação de potencial elétrico extra (C), após 24 h de contato com o polímero. Adaptado de Schmidt *et al.*, 1997.

Levando em consideração características como pequeno tamanho, estrutura microporosa e biocompatibilidade do PPy, este polímero oferece um amplo espectro de uso na área da saúde (Oh *et al.*, 2010; Vaitkuvienė *et al.*, 2014). Hoje em dia existe uma grande variedade de formulações para sistemas de entrega de drogas, incluindo micropartículas poliméricas e implantes (Unger *et al.*, 2007; Amidi *et al.*, 2008) com estruturas capazes de desencadear a liberação do fármaco em resposta a discretas transições termais (Kharlampieva *et al.*, 2005), de pH (Oh *et al.*, 2004; Serizawa *et al.*, 2005) ou estímulo elétrico (Auguste *et al.*, 2006; Wadhwa *et al.*, 2006). Aliado ao estímulo elétrico e a capacidade de propagar condutância elétrica, características bem descritas do PPy, são promissoras as incorporações de drogas durante a síntese do polímero e posterior liberação controlada (Sirivisoot *et al.*, 2011; Esrafilzadeh *et al.*, 2013), o que pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças agudas e/ou crônicas. Exemplo disso é o estudo realizado por Sirivisoot e colaboradores (2011), onde o PPy foi empregado como agente carreador de alguns fármacos (dexametasona, penicilina e estreptomicina) e promoveu a liberação controlada e duradoura destes fármacos através da sua capacidade de condutância (Sirivisoot *et al.*, 2011). Nanomateriais à base de grafeno também são promissores para o uso em sistemas de entrega de drogas, sendo carreadores, por exemplo, de fármacos (Zhang *et al.*, 2010). NPs de grafeno e pontos quânticos de carbono (PQC) também demonstraram serem bons dispositivos para visualização *in vivo* de tumores cerebrais e como dispositivo de bioimagem, respectivamente (Yang *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015).

O uso do PPy, além de ser bem descrito para aplicações na área da saúde, também é promissor para aplicações nas áreas eletrônica e óptica, devido a sua polimerização, estabilidade ambiental e condutividade elétrica que podem ser controladas pela mudança do grau de dopagem (Wang & Fernandez, 1992). A deposição do PPy na superfície de fibras de

tecidos e fios tais como algodão (Onar *et al.*, 2009), poliéster (Molina *et al.*, 2009), poliamida (Najar *et al.*, 2007), seda (Cucchi *et al.*, 2009) e derivados de celulose (Beneventi *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2011) têm sido amplamente investigado nos últimos anos com a intenção de melhorar materiais de apoio na área médica. Exemplo disso é a utilização do PPy em aplicações têxteis (Varesano *et al.*, 2009; 2013) mostrando excelentes propriedades antibacterianas (Sayyah *et al.*, 2014) e antimicrobianas (Cabuk *et al.*, 2014), sugerindo sua aplicação em vestimentas hospitalares. Além destas aplicações, filmes de PPy aplicados em alguns tipos de implantes ajudam a otimizar a viabilidade e durabilidade destes materiais (Ungureanu *et al.*, 2014). Por exemplo, PPy quando depositado em próteses de titânio protege contra a corrosão (Mindroiu *et al.*, 2010; Popescu *et al.*, 2010a; b), além de acelerar processos de osteointegração (Wong *et al.*, 1994) através do auxílio do enxerto de moléculas biologicamente ativas no nanomaterial (Mindroiu *et al.*, 2013a; b).

1.4. Nanotoxicidade do polipirrol e nanomateriais à base de carbono

A área da nanotecnologia tem se expandido nas últimas décadas. Este fato pode ser explicado a partir dos investimentos na área, onde em dois mil e um foram investidos 500 milhões de dólares e em dois mil e dez 1,8 bilhões de dólares (Shapira & Wang, 2010). As NPs têm características especiais que as distinguem das partículas em escala macro (Gwinn & Vallyathan, 2006). Estas propriedades incluem principalmente o tamanho nano, mas que em contrapartida oferece uma ampla área de superfície (Wu & Tang, 2018).

Assim como a maioria das tecnologias emergentes, incluindo inovações na área da medicina e os dispositivos médicos, há um crescente debate das questões relativas aos possíveis efeitos adversos derivados do uso de partículas em escala nano. No entanto, as avaliações dos riscos associados com a exposição às NPs bem como as rotas de entrada e mecanismos moleculares envolvidos em eventos de nanotoxicidade, ainda estão longe de ser totalmente compreendidos (Medina *et al.*, 2007). De fato, pequenas partículas em geral são capazes de entrar no corpo através da pele, pulmões ou pelo trato intestinal, depositando-se em diversos órgãos e causando reações adversas através da modificação de suas propriedades físico-químicas (Oberdörster *et al.*, 2005a; b). Além disso, a toxicidade das NPs dependerá também de como são metabolizadas ou eliminadas dos diferentes órgãos, bem como a resposta do organismo frente a este xenobiótico (Shvedova *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2004; Radomski *et al.*, 2005; Donaldson *et al.*, 2006). Consequentemente, parece razoável a

avaliação dos riscos/benefícios do uso de nanopartículas em qualquer dispositivo médico ou tecnológico (Medina *et al.*, 2007).

Atualmente, existem poucos estudos que abordem as questões de toxicidade e biodistribuição envolvendo o polímero PPy. Os poucos resultados disponíveis são avaliados a partir de ensaios *in vitro* (Kim *et al.*, 2011; Vaitkuvienė *et al.*, 2013) e dos efeitos locais *in vivo* em roedores (Wang *et al.*, 2004; Ramanaviciene *et al.*, 2007; George *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* realizados por Kim e colaboradores (2011) demonstraram que a viabilidade celular, bem como análises de estresse oxidativo, apoptose e necrose apresentaram resultados citotóxicos de forma tamanho- e dose-dependente às NPs de PPy (Kim *et al.*, 2011). Vaitkuvienė e colaboradores (2013) também avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de diferentes concentrações de NPs de PPy com base na morfologia e viabilidade/proliferação das células, onde observou-se que baixas concentrações de PPy em cultivo celular não apresentaram toxicidade, no entanto, altas concentrações mostraram-se com perfil citotóxico, de forma dose-dependente (Vaitkuvienė *et al.*, 2013).

Estudos *in vivo* são essenciais para uma correta análise e interpretação dos efeitos acumulativos e toxicológicos, principalmente de NPs não biodegradáveis (Medina *et al.*, 2007), mas que são de grande interesse para a área biomédica, como é o caso do PPy e de outros materiais à base de carbono. Embora haja um aumento exponencial na produção, no comércio e na aplicação das NPs, por outro lado, há uma lacuna no entendimento sobre sua potencial toxicidade na saúde. Esta falta de conhecimento resulta na obrigação ética de tomar as precauções necessárias em relação ao seu uso para minimizar a exposição ocupacional e ambiental (Gwinn & Vallyathan, 2006).

Os diversos nanomateriais podem causar importante resposta inflamatória pulmonar, além de eventos como estresse oxidativo através da interação com macromoléculas celulares, em função de sua ampla área de superfície (Dick *et al.*, 2003; Donaldson *et al.*, 2004). Outras características biofísicas dos nanomateriais, tais como tamanho e propriedades de superfície também contribuem para aumentar sua distribuição, acumulação e captação a partir de várias vias, podendo afetar diversas funções celulares bem como órgãos específicos (Almeida *et al.*, 2011; Isama, 2014). Diferentes tipos de nanopartículas (incluindo as com base de carbono) podem entrar no organismo por várias rotas: via epiderme e/ou brânquias (exposição dérmica), via trato gastro intestinal (exposição oral; GI), via sistema nervoso central (SNC) ou via sistema respiratório (inalação) (Medina *et al.*, 2007; Pomeroy *et al.*, 2017) (Figura 5).

Esta última rota de exposição é aplicável para organismos com pulmões, enquanto que as outras vias podem ser aplicadas para todos os modelos multicelulares (Pomeroy *et al.*, 2017).

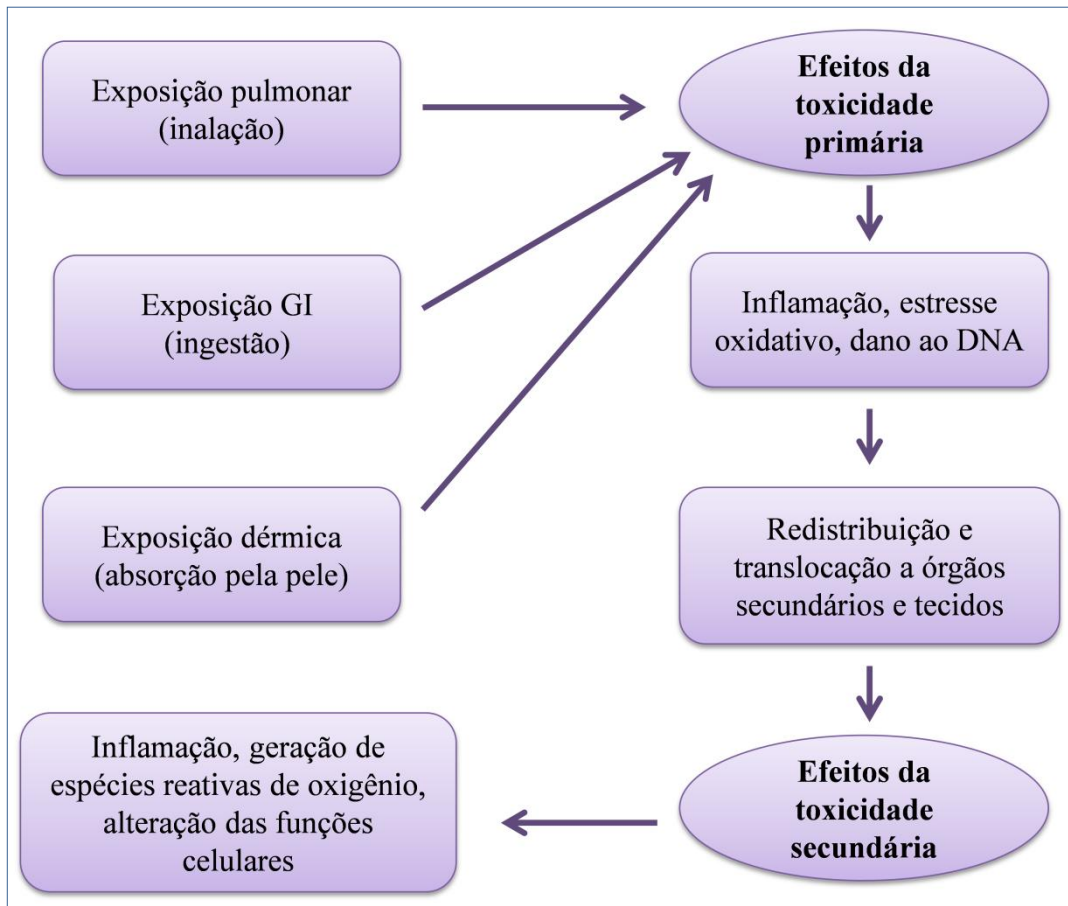


Figura 5. Diagrama esquemático de diferentes rotas de exposição às nanopartículas. Rotas de exposição das nanopartículas e sua associação com os efeitos toxicológicos. GI: Gastro Intestinal. Adaptado de Missaoui *et al.*, 2018.

Pesquisas utilizando vários modelos animais mostraram que as NPs têm potencial de acumular-se em diferentes órgãos e assim, causar diferentes riscos à saúde (Chen *et al.*, 2015a). A toxicidade causada pelos nanomateriais em órgãos vitais depende, entre outros fatores, essencialmente das rotas de exposições e das propriedades químicas e biofísicas destes materiais. Além disso, o acúmulo das NPs pode acabar alterando o perfil de absorção, distribuição, metabolização e excreção em determinados órgãos (Missaoui *et al.*, 2018). Kang e colaboradores (2015) utilizaram embriões e larvas de *zebrafish* como modelo para avaliar imagens *in vivo* da aplicação e distribuição tecidual de PQC. Nos embriões verificou-se que os PQC atravessaram os poros do ovo e, por endocitose, penetraram no anel germinativo, depositando-se preferencialmente no saco vitelínico. Nas larvas, os PQC foram incorporados

através da ingestão e da absorção cutânea, evidenciando o acúmulo seletivamente na região da cabeça, no saco vitelínico e na cauda. Este estudo enfatiza que determinados materiais à base de carbono têm afinidade tecido-dependente (Kang *et al.*, 2015). Em relação às rotas de distribuição, é possível afirmar que os PQC entram no *zebrafish* principalmente através da deglutição e absorção cutânea (Reddy *et al.*, 2012) e podem ser excretados parcialmente pelo intestino. Alguns PQC entram no sistema cardiovascular e são distribuídos através de todo o organismo, principalmente pelos vasos sanguíneos (Kang *et al.*, 2015).

Uma das rotas mais importantes de entrada das NPs é, sem dúvida, o sistema respiratório (Medina *et al.*, 2007), pois estudos têm demonstrado que a exposição respiratória à diferentes diâmetros de NPs podem induzir reações inflamatórias nos pulmões de animais experimentais (Gilmour *et al.*, 2004; Dailey *et al.*, 2006). Existe uma importante correlação entre a área de superfície da NP e a indução inflamatória, pois foi observado um aumento dos níveis de estresse oxidativo (Brown *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, o aumento da transcrição de genes pró-inflamatórios como IL-8, IL-6 e TNF (Salvi *et al.*, 2000). Interessantemente, diferentes tipos de NPs podem induzir vários tipos de reações inflamatórias, por exemplo, nanotubos de carbono de parede simples são considerados mais tóxicos se comparados a outros tipos de nanomateriais de carbono. Estes podem induzir a granuloma epitelial dose-dependente e inflamação intersticial nos pulmões de camundongos (Lam *et al.*, 2004). Por outro lado, alguns estudos têm sugerido que estes efeitos tóxicos são, na maioria das vezes, localizados nos pulmões e que exposição pulmonar às NPs de carbono não causam efeitos sistêmicos tóxicos de grande importância em outros órgãos ou tecido extra-pulmonar (Bhirde *et al.*, 2010; Warheit *et al.*, 2010). No entanto, mais pesquisas são necessárias para resolver estas controvérsias, uma vez que podem ter grande impacto na saúde humana.

De acordo com a toxicocinética das NPs, estas podem evitar as defesas fagocíticas do sistema respiratório e assim, ter acesso ao sistema circulatório ou mesmo ao SNC. Uma vez que, as NPs são inaladas e depositadas, elas podem se translocar para local extrapulmonar e alcançar outros órgãos através de diferentes mecanismos (Medina *et al.*, 2007). Um dos primeiros mecanismos envolve a passagem de NPs através do epitélio do trato respiratório, que pode ter acesso a corrente sanguínea diretamente ou por via linfática. Isto resulta em uma distribuição sistêmica dos nanomateriais para os gânglios linfáticos mediastinais ocasionando o aumento da expressão de mRNAs de quimiocinas nos pulmões e gânglios linfáticos (Win-Shwe *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2007). Da mesma forma, Win-Shwe e colaboradores (2006) também verificaram o aumento da expressão de mRNAs de citocinas e quimiocinas pró-

inflamatórias após a instilação de partículas de carbono no bulbo olfatório de camundongos (Win-Shwe *et al.*, 2006). Oberdörster e colaboradores (2004) verificaram que a inalação de partículas ultrafinas de carbono-13 levou a um significativo e persistente aumento da acumulação destas NPs no bulbo olfatório de ratos (Oberdörster *et al.*, 2004), e que estas partículas de carbono podem alcançar a corrente sanguínea após um minuto de exposição (Nemmar *et al.*, 2002).

No momento em que as NPs são translocadas para a corrente sanguínea, elas podem induzir efeitos biológicos adversos em vários órgãos, a depender da afinidade do nanomaterial com o tecido em questão (Medina *et al.*, 2007). Corroborando com estes achados, Chen e colaboradores (2015) também verificaram a distribuição corporal do óxido de grafeno em larvas de *zebrafish* após terem alcançado a corrente sanguínea (Chen *et al.*, 2015a). Estudos prévios mostraram que NPs e nanotubos de carbono induziram agregação plaquetária *in vivo* e podem acelerar a taxa de trombose vascular nas artérias carótidas de ratos (Radomski *et al.*, 2005). NPs de carbono também podem induzir diretamente mudanças morfológicas citotóxicas em células endoteliais da veia umbilical de humanos, induzir resposta inflamatória e/ou inibir o crescimento celular (Yamawaki & Iwai, 2006). Vários estudos já demonstraram a toxicidade de materiais à base de carbono em relação ao sistema cardiovascular do *zebrafish*. Entre estes achados incluem má formação cardíaca, edema de pericárdio e bradicardia (Liu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015a; b; Wang *et al.*, 2015; Manjunatha *et al.*, 2018).

Algumas NPs não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (Kang *et al.*, 2015), assim como a maioria não é capaz de induzir significativa toxicidade neste órgão. De fato, existem algumas NPs com capacidade de se acumularem no cérebro por penetrarem através de difusão passiva ou através de receptores que medeiam a endocitose (Hoet *et al.*, 2004). Entretanto, sabe-se que o deslocamento de NPs ao SNC não resulta somente da distribuição sistêmica, mas também contribuem para isso as terminações nervosas sensoriais do epitélio respiratório, seguido da translocação axonal até as estruturas ganglionares do SNC (Medina *et al.*, 2007). Além disso, as NPs podem ser depositadas nas terminações nervosas do bulbo olfatório e deslocadas até o SNC em peixes, onde estudos prévios demonstraram que fulerenos podem induzir estresse oxidativo no cérebro de peixes via bulbo olfatório (Oberdörster, 2004), bem como carbono-13 pode acumular-se no cérebro e no cerebelo de ratos (Oberdörster *et al.*, 2004). Há NPs que são mais difíceis de serem eliminadas fisiologicamente e podem ser acumuladas no cérebro por longos períodos e desencadear efeitos tóxicos (Hu & Gao, 2010), onde componentes nano de matéria particulada podem

chegar até o cérebro e assim serem associadas com doenças neurodegenerativas (Peters *et al.*, 2006). Interessantemente, o estudo realizado por Ren e colaboradores (2016) mostrou que o óxido de grafeno causou sintomas do tipo Parkinson em larvas de *zebrafish* (Ren *et al.*, 2016). Corroborando, é possível verificar alterações comportamentais neste mesmo modelo animal quando expostos a pontos quânticos de grafeno e óxido de grafeno (Cheng & Cheng, 2012; Wang *et al.*, 2015). Além do perfil locomotor alterado, Soares e colaboradores (2017) também verificaram que o óxido de grafeno causou dano celular cerebral acompanhado da diminuição dos níveis de dopamina (Soares *et al.*, 2017). Em conjunto, estes achados sugerem que as NPs podem estar envolvidas em eventos inflamatórios a nível cerebral, uma vez que, neste órgão as células da microglia podem ser ativadas resultando na regulação da expressão de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (Win-Shwe & Fujimaki, 2011).

Outra forma das NPs entrarem no organismo é através do trato GI e pela exposição dérmica. Nanomateriais podem ser ingeridos a partir do alimento, água, fármacos e até mesmo cosméticos. Além disso, NPs podem depositar-se no trato GI quando são removidas do trato respiratório (Hoet *et al.*, 2004). Sabe-se que a cinética de captação de partículas no trato GI depende da difusão e acessibilidade através da mucosa, interação com enterócitos e tráfego celular. As menores partículas têm habilidade de se difundirem rapidamente através das secreções do trato GI e assim alcançam os enterócitos colônicos (Szentkuti, 1997). Visto que estas minúsculas partículas apresentam um perfil tóxico e inflamatório mais significativo do que o mesmo material em escala macro (Donaldson *et al.*, 2001a; b). A partir da captação pelo trato GI, as NPs podem deslocar-se pela corrente sanguínea e distribuir-se por todo o organismo (Jani *et al.*, 1990), sugerindo assim, que a camada epitelial do trato GI seja uma importante rota para a captação e distribuição de nanomateriais (Pomeroy *et al.*, 2017). Assim como os pulmões, o trato GI é facilmente exposto a estímulos que podem levar a uma resposta inflamatória (Medina *et al.*, 2007). De acordo com Chen e colaboradores (2016) a exposição ao óxido de grafeno no modelo *zebrafish* levou a alterações celulares no intestino, apresentando vacuolização, perda do arranjo e contorno celular, além de histólise (Chen *et al.*, 2016). No entanto, Filho e colaboradores (2014) verificaram através de microscopia ótica que nanotubos de carbono foram eliminados do intestino do *zebrafish* após sua exposição, não apresentando sinais de toxicidade (Filho *et al.*, 2014).

Baseado em pesquisas prévias, as NPs demonstraram capacidade de atingir outros tipos de órgãos, além dos discutidos anteriormente. Nanomateriais também podem ser captados pelos gânglios linfáticos em nível de exposição dérmica, deslocando-se para a corrente

sanguínea através da via linfática (Kim *et al.*, 2004). Contudo, deve-se mencionar que, embora as nanopartículas possam lesar a pele quando administradas por exposição dérmica, há poucas evidências de danos sistêmicos ou mesmo em órgãos internos (Ryu *et al.*, 2014). Com base em pesquisas prévias, o óxido de grafeno não foi capaz de causar alterações histológicas nas brânquias do *zebrafish* (Chen *et al.*, 2016), no entanto, nanotubos de carbono demonstraram causar aneurisma, hiperemia e inflamação nas brânquias do animal (Filho *et al.*, 2014). Além destes achados, Deng e colaboradores (2018) verificaram a presença de apoptose nos neuromastos do *zebrafish* quando expostos a pontos quânticos de grafeno (Deng *et al.*, 2018). Assim como a maioria dos agentes tóxicos, os efeitos das NPs são dose-dependentes (Missaoui *et al.*, 2018) e mais pesquisas são necessárias para investigar os reais efeitos dos nanomateriais sobre a pele.

Semelhante aos agentes químicos, a toxicidade dos nanomateriais é dependente de sua dose, estrutura e propriedades físico químicas. Para as NPs, estas propriedades incluem o tamanho, a área e a carga de superfície (Wu & Tang, 2017), conforme descrito anteriormente. Mudanças nestas propriedades podem afetar a sua interação com várias proteínas e outros marcadores, alterando sua distribuição e deslocamento em diferentes órgãos (Kreyling *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstraram que impurezas contidas nos nanotubos de carbono (Cheng *et al.*, 2007), bem como a carga da superfície introduzida no nanomaterial durante a síntese (Fahlgren *et al.*, 2015; Gilbertson *et al.*, 2016) são fatores preditivos na mortalidade de embriões de *zebrafish* e na biocompatibilidade *in vitro*. Ferraz e colaboradores (2012) chamaram a atenção para a estabilidade do PPy em relação a biocompatibilidade *in vitro*, a qual, entre outros fatores, está relacionada com o pré-tratamento, lavagens sucessivas do material após a síntese e condições de armazenamento (Ferraz *et al.*, 2012).

Outra questão ligada a biocompatibilidade dos nanomateriais, seja *in vitro* ou mesmo *in vivo*, está relacionada à característica da solubilidade. A insolubilidade de nanomateriais à base de carbono em meio aquoso já foi descrita em estudos prévios (Cho *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2017) e a alternativa para essa questão hidrofóbica é a utilização de surfactantes para a dispersibilidade destes materiais (Pan *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2018). Surfactantes poliésteres não iônicos, como os copolímeros triblocos (também conhecidos como *poloxamer* ou Pluronic[®]), são frequentemente utilizados como dispersantes na preparação de várias suspensões contendo NPs (Wang *et al.*, 2013). Especialmente com NPs à base de carbono, como nanotubos de carbono e grafeno, que são de grande interesse em aplicações industriais e na área da saúde em sistemas de entrega de drogas com liberação

controlada de fármacos (Schmolka, 1977; Cho *et al.*, 2016). Atualmente existem mais de 50 tipos de *poloxamers*, com variações relacionadas ao peso molecular, propriedades físico-químicas e aplicabilidade na forma de líquido, pasta ou sólido (Alexandridis & Hatton, 1995). *Poloxamers* são formados por dois blocos de polietilenoglicol (PEG) e um bloco de polipropilenoglicol (PPG) de vários tamanhos e são populares em estudos de nanotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, pois são dispersantes relativamente não tóxicos. Tipicamente, as NPs são sonicadas com o *poloxamer* de escolha para produzir uma suspensão homogênea. As suspensões são então produzidas com o auxílio de sonificadores ultrassônicos (ultrassom de ponteira ou banho ultrassônico) com frequência variada, diferentes níveis de potência, regimes de pulso e com tempos de sonicação que podem variar de poucos minutos até mais de 6 horas (Suslick & Flannigan, 2008). Por tanto, a escolha e a concentração do surfactante utilizado, bem como o tratamento empregado para a etapa da dispersão também contribuem significativamente na biocompatibilidade (Pan *et al.*, 2011; Wojtoniszak *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2016; Sassa-deepaeng *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Entre os *poloxamers* de escolha para a dispersão de nanopartículas à base de carbono está o *poloxamer* 188 (Pluronic[®] F-68; PF68). Já foi reportado em testes de nanotoxicidade o uso de PF68 na concentração de 1%, apresentando boa dispersibilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, quando disperso com as NPs no meio do *zebrafish* (Wojtoniszak *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2017). Assim, qualquer tentativa com o objetivo de minimizar a toxicidade das NPs através da alteração de suas propriedades biofísicas deve ser balanceada com a sua funcionabilidade (Missaoui *et al.*, 2018).

1.5. *Zebrafish* como modelo animal em estudos de nanotoxicidade

Estudos *in vivo* são necessários para avaliar mais precisamente a resposta do organismo como um todo frente à exposição aos nanomateriais. O deslocamento de NPs através de barreiras biológicas em um organismo, a toxicidade específica a um órgão, a interferência de partículas no desenvolvimento embrionário, bem como a toxicidade reprodutiva não podem ser avaliadas em experimentos *in vitro* (Pan *et al.*, 2013). Porém, pesquisas nanotoxicológicas envolvendo cultura celular são estratégicas para elucidar o mecanismo de ação das NPs sem a influência de vieses como o alimento, o sistema endócrino e outras variáveis. Sendo assim, a combinação de estudos *in vitro* e *in vivo* podem refinar o entendimento dos riscos associados aos nanomateriais (Win-Shwe & Fujimaki, 2011).

O órgão legislativo da Comunidade Européia para uso de químicos (REACH, do inglês: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) e os seus anexos regulamentares para o uso de nanomateriais, determinam diretrizes específicas para a avaliação dos riscos associados às NPs (REACH). Reforçando que estudos envolvendo animais são indispensáveis para obter um perfil abrangente da toxicidade de substâncias químicas. Com base nesta premissa, o Instituto Federal Alemão para Avaliação de Risco estimou que 45 milhões de animais de laboratório sejam utilizados como cobaias para contemplar as normativas da legislação REACH (Hofer *et al.*, 2004). No entanto, por questões éticas e de custos laboratoriais, torna-se oneroso para a pesquisa os ensaios envolvendo modelos mamíferos (tais como roedores). Assim, o *zebrafish* (*Danio rerio*), também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, surge como uma alternativa adequada para os estudos de toxicidade sistêmica e de órgãos específicos, bem como para a interpretação de vias específicas de defesa ou desintoxicação desencadeadas por nanomateriais. Sendo assim, o modelo animal contempla o Princípio Humanitário da Experimentação Animal utilizando o Princípio dos 3 Rs (do inglês: *reduction, replacement, refinement* - redução, substituição e refinamento) (Lei Arouca, 2008).

O interesse no uso deste modelo, tanto no estágio embrionário quanto adulto para os estudos de toxicologia e pesquisas na área biomédica é grande devido a diversas vantagens. O *zebrafish* é um teleosteo de água doce de baixo custo de manutenção quando comparado a outros animais (por exemplo, roedores), tem grande número de progênes (um acasalamento pode dar origem a cerca de 100 – 200 ovos) e rápida ontogênese (chegando a fase adulta em cerca de três meses). Adicionalmente, a fecundação é externa e a transparência óptica durante os estágios iniciais (embriões e larvas) permite o acompanhamento dos processos iniciais de desenvolvimento e morfologia dos órgãos em tempo real, tornando-se atrativos para um *screening* toxicológico (Parng *et al.*, 2002; Tucker & Lardelli, 2007; Oliveira *et al.*, 2017; Brundo & Salvaggio, 2018). Além disso, o genoma foi sequenciado por completo e seus genes partilham entre 60% e 80% de homologia com os humanos (Lessman, 2011; Brundo & Salvaggio, 2018), sugerindo que os resultados obtidos com o modelo podem servir como base para interpretações de riscos associados à saúde humana (Amsterdam *et al.*, 2004). Além da avaliação da toxicidade aguda, os ensaios utilizando embriões adapta-se muito bem a medidas cinéticas (Schreiber *et al.*, 2009), análise funcional da expressão gênica, investigação da resposta imune na presença de NPs (Kosmehl *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2009), assim como a previsão de efeitos nanotoxicológicos a longo prazo (Cheng *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Com base nestas evidências, a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) desenvolveu o *Test Guideline 236* (TG236 – FET, do inglês: *Fish Embryo Acute Toxicity Test*) para o uso específico do *zebrafish* em testes de toxicidade envolvendo agentes e materiais químicos (OECD TG 236, 2013).

Muito embora várias pesquisas tenham fornecido evidências dos efeitos nocivos de alguns nanomateriais, a compreensão dos potenciais problemas de saúde e da segurança em relação ao uso das NPs, não são completamente elucidados na mesma velocidade e importância em que há a comercialização destes insumos. Em relação ao particulado de PPy, até o momento sabe-se que ele apresenta considerável grau de biocompatibilidade quando utilizado na forma de implantes na medicina regenerativa através de testes em modelos *in vivo* (George *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2015). Os estudos envolvendo a possível toxicidade do polímero nos protocolos de enxertos se detêm apenas em avaliar se há a presença de infiltrado inflamatório ou dano tecidual que envolva os tecidos adjacentes a lesão. Raros são os estudos *in vitro* envolvendo a citotoxicidade e a resposta imune inata relacionada ao tamanho e principalmente a concentração exposta do PPy (Kim *et al.*, 2011; Vaitkuviene *et al.*, 2013). Portanto, estudos utilizando o modelo *zebrafish* quando em exposição ao polímero PPy são necessários para *screenings* básicos de nanotoxicidade, pois oferecem rápida resposta e robustez de resultados em uma abordagem sistêmica.

2. JUSTIFICATIVA

A área da nanotecnologia tem crescido rapidamente durante as últimas décadas, devido em parte, ao uso das NPs em vários processos manufaturados, em dispositivos clínicos no tratamento de doenças ou para potenciais sistemas de entrega de drogas. Este cenário tem criado novas oportunidades para que humanos possam ser expostos à nanomateriais. Infelizmente, as pesquisas realizadas com o objetivo de investigar os efeitos indesejados dos nanomateriais (por exemplo, a nanotoxicidade), bem como os potenciais riscos à saúde humana e o impacto no meio ambiente, não acompanharam o rápido aumento do uso destes insumos nas mais diversas áreas.

A falta de conhecimentos mais profundos e refinados dos impactos causados pelas NPs na saúde humana tem criado uma lacuna de conhecimentos e uma substancial necessidade e urgência de mais estudos em materiais à base de carbono. Pesquisas *in vivo* são necessárias para ajudar no entendimento dos mecanismos de toxicidade dos nanomateriais, bem como os mecanismos subjacentes a sua distribuição e acumulação em células e tecidos e também da sua eliminação do organismo. Neste sentido, este trabalho visa explorar a biocompatibilidade da exposição de diferentes concentrações do particulado de PPy (dopado com ácido *p*-toluenosulfônico; PPy/*p*-TSA) durante o desenvolvimento embrional e larval do modelo animal *zebrafish*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a biocompatibilidade do polímero de PPy/*p*-TSA em diferentes concentrações durante o desenvolvimento de embriões e larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*).

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar o particulado de PPy/*p*-TSA;
- Caracterizar a estabilidade das dispersões do PPy/*p*-TSA em diferentes concentrações, para posterior exposição *in vivo*;
- Avaliar o efeito da exposição de diferentes concentrações do PPy/*p*-TSA sobre a taxa de sobrevivência dos embriões e das larvas de *zebrafish* através de curva dose-resposta;
- Avaliar o efeito da exposição de diferentes concentrações do PPy/*p*-TSA sobre a taxa de eclosão dos embriões de *zebrafish*;
- Avaliar os movimentos espontâneos dos embriões submetidos à exposição de diferentes concentrações do PPy/*p*-TSA;
- Avaliar os batimentos cardíacos dos embriões submetidos à exposição de diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA;
- Avaliar a distribuição do particulado de PPy/*p*-TSA em diferentes concentrações sobre o córion dos embriões de *zebrafish*;
- Analisar as possíveis alterações morfológicas nas larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA;
- Identificar possíveis alterações comportamentais através da atividade locomotora das larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA;
- Determinar a presença de morte celular através do ensaio de laranja de acridina em larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA;
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase (marcador inflamatório) em larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em larvas de *zebrafish* após a exposição a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA;
- Avaliar a distribuição *in vivo* do particulado de PPy/*p*-TSA em larvas de *zebrafish* por Microscopia Eletrônica de Transmissão;

- Avaliar o padrão de expressão de genes marcadores de hipóxia, inflamação e estresse oxidativo por biologia molecular em larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de PPy/p-TSA.

CAPÍTULO II

“Adverse effects of *p*-TSA-doped polypyrrole
particulate exposure during *zebrafish*
(*Danio rerio*) development”

Manuscrito publicado no periódico *Colloids
and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019.



Adverse effects of *p*-TSA-doped polypyrrole particulate exposure during zebrafish (*Danio rerio*) development

Kesiane M. Costa^{a,b}, Talita C.B. Pereira^{a,c,*}, Cristhiane A. Valente^{d,e}, Kenia Pissinate^f,
Jéssica C. Soares^{a,c}, Fernanda F. Cruz^c, Temis W.F. Corte^g, Pablo Machado^{c,f}, Nara R.S. Basso^{d,e},
Maurício R. Bogo^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Genomics and Molecular Biology, School of Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Graduate Program in Medicine and Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Organometallic Compounds and Resins Laboratory, School of Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Graduate Program in Materials Engineering and Technology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^f National Institute of Science and Technology in Tuberculosis, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^g Cosmetology Laboratory, School of Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

PPy
PPy/*p*-TSA
Nanomaterials
Nanotoxicity
Zebrafish development
Behavior

ABSTRACT

Nanomaterials have been attracting attention due to the wide range of applications in nanomedicine. Polypyrrole (PPy), a conductive polymer, has been employed in the biomedical field due to its stimulus-responsive properties, although *in vivo* studies to assess its potential undesirable effects are limited. This study evaluated the effects of PPy doped with *p*-toluene sulfonic acid (*p*-TSA); PPy/*p*-TSA exposure (at 25, 100, 250 and 500 µg/mL) during six consecutive days on mortality, hatching, spontaneous movement, heart rate, morphology and locomotion behavior of zebrafish embryos/larvae. Additionally, PPy/*p*-TSA envelopment of developing embryo chorions and gene expression of a hypoxia-related marker in this context were also evaluated. No significant mortality was found; however, altered heart rate and early hatching was identified in all exposed groups at 48 hours post-fertilization (hpf). Surprisingly, with the 500 µg/mL dose, hatching initiated as early as 24 hpf. PPy/*p*-TSA adhered to and enveloped the chorion of embryos in a time- and dose-dependent fashion; morphological changes in body length and ocular distance were found with higher concentrations. PPy/*p*-TSA-exposed animals showed locomotor behavioral alterations compatible with hypoactivity. A significant increase in the turn angle with a concomitant reduction in meander was also verified at higher concentrations. Taken together, these results emphasize the adverse effects of PPy/*p*-TSA on zebrafish development and behavior. Some effects of PPy/*p*-TSA exposure were dose-dependent, and indicate specific adverse effects of PPy/*p*-TSA on zebrafish development and behavior.

1. Introduction

Conductive polymers are used in a number of applications. Their physical properties and biocompatibility have drawn attention in terms of applications in the biomedical field, taking advantage of their electrical stimuli potential [1]. Among several types of conductive polymers, polypyrrole (PPy), as a planar array of pyrrole (Py) monomers [2], has been studied and employed in drug delivery systems, nerve regeneration and biosensor coatings for neural probes [3]. Interest in PPy applications in nanomedicine is increasing and PPy biocompatibility has been reported with promising *in vivo* scaffold results

regarding nervous tissue regeneration [4,5], substrates for different purposes where maintaining the adhesion and proliferation of *in vitro* cells is required [6] and as drug delivery systems. For instance, it has been reported that PPy doped during its synthesis with ciprofloxacin, an antibiotic, is able to release the drug by switching the redox state of the conductive polymer [7]. Furthermore, titanium-based implants containing another antimicrobial agent, torularhodine, in a PPy film resulted in a corrosion-protective coating with antibacterial activity [8], which may fulfill an interesting alternative in terms of implant longevity.

Although the biocompatibility of PPy has been documented, some

* Corresponding authors at: Laboratory of Genomics and Molecular Biology, School of Sciences, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12C - sala 134, CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: talitapereira@gmail.com (T.C.B. Pereira), mbogo@puccs.br (M.R. Bogo).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.041>

Received 23 November 2018; Received in revised form 17 January 2019; Accepted 21 January 2019

Available online 24 January 2019

0927-7765/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

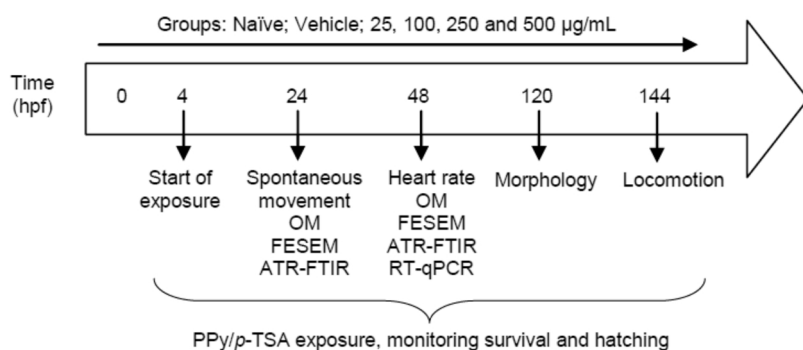


Fig. 1. Experimental design of zebrafish exposure to PPY/p-TSA. Daily exchanged PPY/p-TSA nanoparticles exposure was performed from up to 4 until 144 hpf. Spontaneous movement, OM, FESEM, ATR-FTIR, heart rate, morphology (in terms of body length, ocular distance and ocular surface area), gene expression and locomotion behavior were analyzed at the indicated time points. OM: optical microscopy; FESEM: Field-Emission Scanning Electron Microscopy; ATR-FTIR: attenuated total reflection Fourier transform infrared.

studies have shown that the PPY nanostructure could be valuable for understanding toxicological endpoints, since some nanoparticles may have toxicity linked to their shape, size, surface composition and concentration [9]. A study analyzed different diameters of PPY nanoparticles in order to evaluate size-dependent cytotoxicity and the innate immune response, and found that PPY-treated human lung fibroblasts (IMR90) and mouse alveolar macrophages (J774A.1) demonstrated a decrease in viability, an increase in oxidative stress and presented apoptosis/necrosis size- and dose-dependency [10]. Corroborating these findings, it has been reported that PPY nanoparticles at lower concentrations are biocompatible, while at higher concentrations they are cytotoxic in a dose-dependent manner to human Jurkat T lymphocytes, mouse hepatoma cells (MH-22A) and primary mouse embryonic fibroblasts (MEF) [11]. So far, little is known regarding the biokinetics of PPY particles and biological interactions using an *in vivo* approach [12]. There is strong evidence that nanoparticles move from primary deposition sites to secondary organs [13] and the transport, accumulation and clearance of nanomaterials in the body are closely associated with their physical form and chemical composition [14]. An *in vivo* representative model organism able to assess the possible nanotoxic effects of PPY is thus imperative, especially for non-biodegradable particles [15,16].

Zebrafish (*Danio rerio*) has been proposed as a model that bridges cell culture and mammalian assays [17], and became an interesting tool for toxicity studies during embryonic and larval stages due to a set of developmental attractive features [18], which, combined with easy handling, give rise to high-throughput and low-cost assays [19]. Several outcomes have been analyzed in other carbon-based nanomaterials using this animal model. Exposure to carbon nanotubes leads to disturbances in zebrafish gills [20] and significant mortality with high multi-walled carbon nanotube (MWNT) concentrations [21]. Regarding the neurotoxic effects, graphene oxide (GO) induces cell damage, decreases dopamine levels [22], increases oxidative stress and induces DNA damage [23]. Embryos exposed to fullerene C₆₀ show necrotic and apoptotic cell death in the head and trunk [24], and alterations in lipid peroxidation and acetylcholinesterase (AChE) activity in the adult zebrafish brain [25].

To the best of our knowledge, the biocompatibility of PPY using zebrafish embryos/larvae or even adults have not been evaluated. Therefore, the primary goal of this study was to evaluate the effects of 6-day PPY doped with *p*-toluene sulfonic acid (*p*-TSA); PPY/*p*-TSA exposure in zebrafish development. For this purpose, we have synthesized and characterized a PPY/*p*-TSA particulate and exposure suspension and then analyzed morphological and physiological parameters to evaluate the potential *in vivo* toxicity of this polymer, in terms of mortality, hatching rate, spontaneous movement, heart rate, morphology and locomotor behavior. In order to further investigate PPY/*p*-TSA suspensions in zebrafish embryo, we also assayed PPY/*p*-TSA envelopment of the chorion, as well as the gene expression of a hypoxia-related marker.

2. Material and methods

2.1. PPY/*p*-TSA synthesis and characterization

PPY/*p*-TSA was synthesized by oxidative polymerization method. The morphology, surface composition and images of PPY/*p*-TSA were measured using field-emission scanning electron microscopy (FESEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM). The spectra of test samples were analyzed using a Fourier transform infrared spectrometer (FTIR); conductivity was determined by a four-point probe method and particle size was estimated by FESEM. In addition, suspensions stability (25, 100, 250 and 500 µg/mL) was monitored through UV-vis spectroscopy (UV-vis), and the average size of particles in suspension was assessed by dynamic light scattering (DLS). Detailed protocols are presented in the Supplementary Material.

2.2. *In vivo* exposure and toxicological endpoints

Zebrafish use and maintenance followed the current national and international guidelines and legislation and the experimental protocols were approved by the institutional animal ethics committee (CEUA-PUCRS-15/00436). The number of animals used was the minimum necessary to demonstrate consistent effects.

Briefly, healthy embryos were exposed to PPY/*p*-TSA suspensions at 25, 100, 250 and 500 µg/mL (plus naïve and vehicle groups) from up to 4 h post-fertilization (hpf) until 144 hpf, with suspensions replaced every 24 h. Toxicity endpoints were evaluated daily, following the experimental design shown in Fig. 1, as previously reported [22,26–29]. Detailed protocols are presented in the Supplementary Material.

2.3. Microscopy and ATR-FTIR analysis

Optical microscopy (OM), FESEM and attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) were conducted to observe PPY/*p*-TSA contact and envelopment of fish embryos surface at 24 and 48 hpf (see Supplementary Material).

2.4. Gene expression analysis by RT-qPCR

Gene expression analyses of *hypoxia inducible factor 1 alpha* (*hif1-α*) was performed as a hypoxia marker, in embryos hatched at 48 hpf in all groups, in accordance with MIQE Guidelines [30] and as detailed in Supplementary Material and as previously reported [31].

2.5. Statistical analysis

The Shapiro-Wilk normality test was performed on all parameters. The Kaplan-Meier test was applied to the mortality curve and two-way analysis of variance (ANOVA) was used with the Bonferroni *post-hoc* test to assess hatching rate. Non-parametric results were analyzed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* test, while

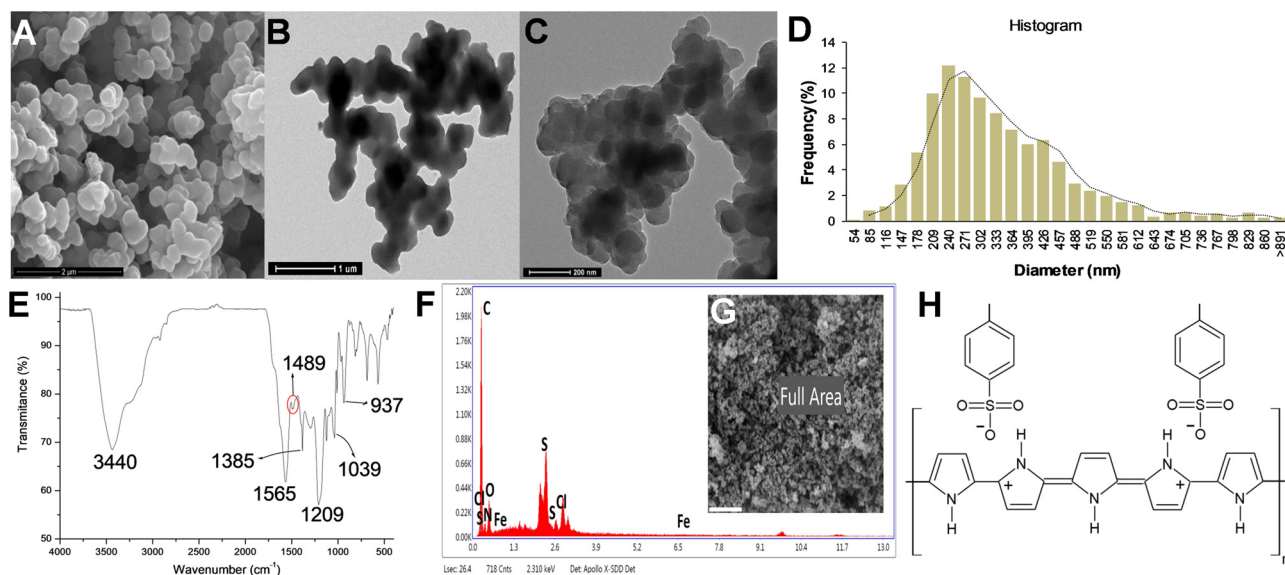


Fig. 2. Characterization of dry PPy/p-TSA. FESEM (A) and TEM (B, C) images of the PPy/p-TSA particles and agglomerates; histogram of statistical size distribution of the PPy/p-TSA particles by FESEM images (D); FTIR spectrum PPy/p-TSA particles (E); EDS analysis of PPy/p-TSA particles (F) with FESEM of the EDS analysis region (G) and molecule structure of PPy/p-TSA particles (H). Scale bar: 5 μm. FESEM: Field-Emission Scanning Electron Microscopy; TEM: Transmission Electron Microscopy; FTIR: Fourier Transform Infrared; EDS: Energy Dispersive x-ray Spectroscopy.

parametric data were evaluated by one-way ANOVA followed by the Bonferroni *post-hoc* test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization and stability of PPy/p-TSA particles

The morphology of p-TSA-doped PPy was characterized by FESEM and TEM (Fig. 2A–C). The dry material images showed a granular morphology with irregular spherical particles. The statistical distribution based on the FESEM images (Fig. 2D) showed that about 84% of particles ranged from 178 to 518 nm in size, with an average of 321 ± 139 nm (mean \pm S.D., $n = 880$) and minimum of 23 nm and maximum of 896 nm. The electrical conductivity of PPy/p-TSA was 4.4×10^{-6} S/cm, within the semiconductor range (10^{-7} – 10^3 S/cm)¹. The FTIR spectrum of doped PPy/p-TSA (Fig. 2E) showed structural characteristics consistent with those of previous reports. The characteristic peaks at 1565 and 1489 cm⁻¹ correspond to the stretching vibration of C=C and C–N of PPy/p-TSA, respectively (the Py-ring fundamental vibration). The peak at 3440 cm⁻¹ was attributed to the N–H stretching vibration and the peak at 1385 cm⁻¹ to the C–H or C–N in-plane deformation [32–34]. The peaks at 1039 and 1209 cm⁻¹ were assigned to symmetric and asymmetric O=S=O stretching vibrations, respectively, and the peak at 937 cm⁻¹ was assigned to a stretching band of -SO⁻³, demonstrating that the synthesized PPy was in a doping state [32,35]. This was also confirmed by EDS analysis, indicating the presence of SO⁻³ groups (Fig. 2F–G). Fig. 2H shows the structure of the PPy/p-TSA molecule.

PPy/p-TSA suspension concentrations were monitored by UV–vis for 24 h (Fig. 3A–B). The PPy/p-TSA suspension stability data showed, respectively, around 12%, 32%, 51% and 66% reductions in nanoparticles in suspensions at 25, 100, 250 and 500 μg/mL, respectively, during the initial 12 h of exposure; after reaching stability, this was maintained for the next 12 h. The lowest concentration (25 μg/mL) showed less precipitation, preserving 89% of nanoparticles in suspension after 24 h (Fig. 3B). The PPy/p-TSA particle size distributions at $t = 0$ h and $t = 24$ h are shown in Fig. 3C–F. It was observed that, at $t = 0$ h, the suspended particle size increased along with the nanoparticle concentration (Fig. 3C–F). The freshly prepared suspensions

($t = 0$ h) presented average particle sizes of 3254 ± 175 , 2616 ± 127 , 5803 ± 215 and 6270 ± 670 nm for the 25, 100, 250 and 500 μg/mL suspensions, respectively. The average particle size that remained in suspension in 24 h ($t = 24$ h) was 886 ± 38 , 1149 ± 216 , 1173 ± 68 and 1341 ± 187 nm for the 25, 100, 250 and 500 μg/mL suspensions, respectively (Fig. 3F).

3.2. Effects of PPy/p-TSA on zebrafish development

To evaluate the potential harmful effects of PPy/p-TSA *in vivo*, several parameters were assessed in zebrafish embryos/larvae exposed to PPy/p-TSA suspensions. As shown in Fig. 4A, mortality did not significantly increase in any group of PPy/p-TSA-exposed animals when compared to the naïve or vehicle groups. Regarding the hatching rate, exposed embryos showed a significant difference in hatching time, when compared with the naïve group (Fig. 4B). The 500 μg/mL-treated group showed early hatching, starting at 24 hpf. At 48 hpf, the vehicle group showed increased hatching compared to the naïve group; however, the exposed groups at the same time point showed a higher hatching *versus* both naïve and vehicle groups.

Embryonic spontaneous movement remained unchanged in all exposed groups when compared to the naïve group, except for a slight increase in the 25 and 250 μg/mL-exposed groups when compared to the vehicle group only (Fig. 5A). The heart rate (Fig. 5B) significantly decreased in both the vehicle and in 500 μg/mL-exposed groups when compared to the naïve group. The 25, 100 and 250 μg/mL-exposed groups showed an increased heart rate when compared with the vehicle group.

3.3. PPy/p-TSA interactions with zebrafish chorion

The OM images (Fig. 6) after 24 and 48 h of exposure show that PPy/p-TSA-exposed zebrafish embryos presented a high amount of PPy/p-TSA aggregation adhered to the surface of the chorion, clearly increasing along with the PPy/p-TSA concentration. In the FESEM images (Fig. 6), it was observed that the chorion of exposed zebrafish embryos was covered with particulates and aggregates of random sizes of PPy/p-TSA, and smaller-sized particulates were compatible with the chorion pore size. Interestingly, the FESEM images also showed an increase in bacterial-like morphologies, which were more abundant when

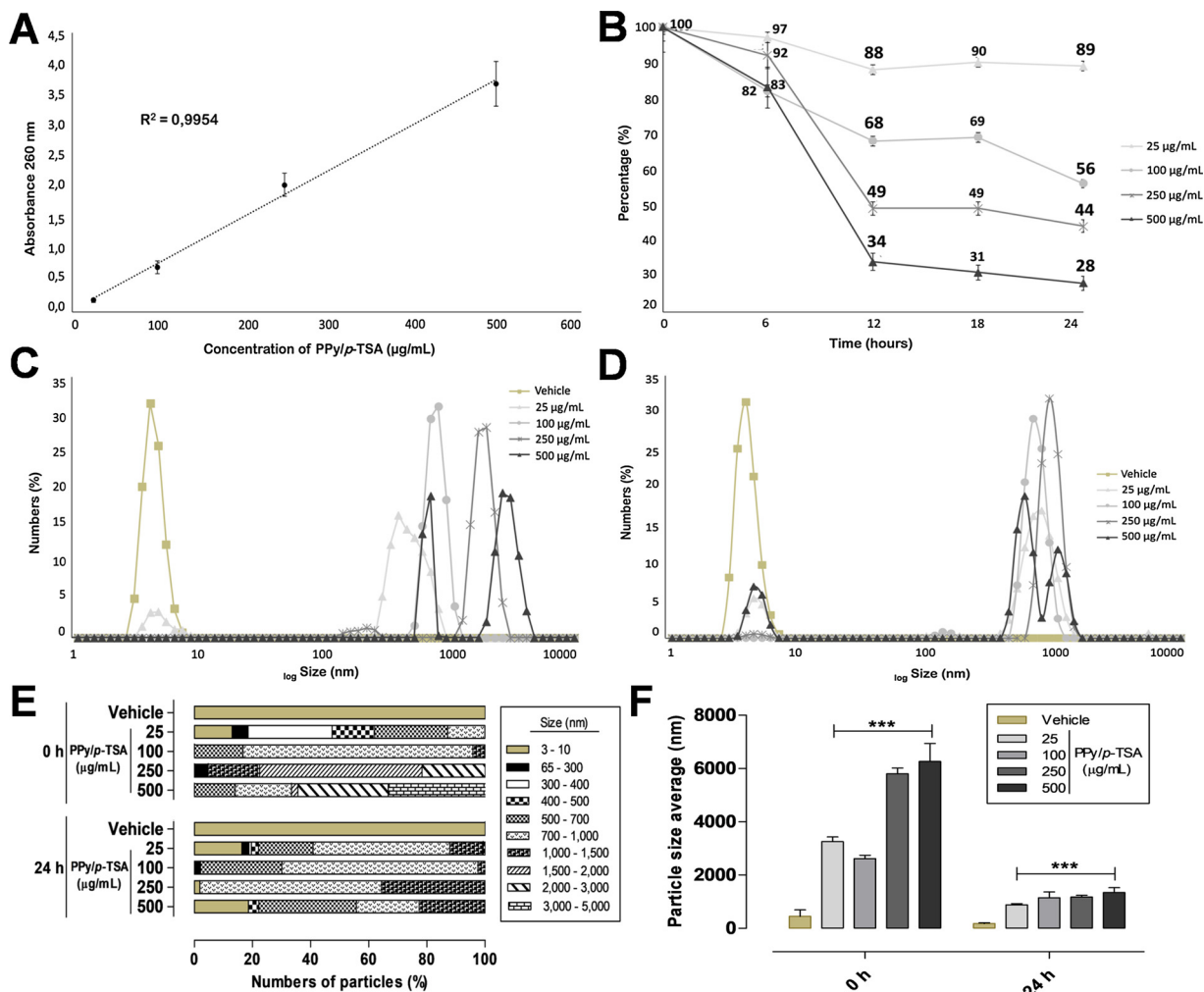


Fig. 3. Stability and characterization of PPy/p-TSA suspensions at 25, 100, 250 and 500 µg/mL with PF68 (1%). Calibration curve (A) and stability evolution (B) of PPy/p-TSA suspensions by UV–vis spectrophotometry (mean ± standard deviation; n = 3). DLS analysis of size distributions of PPy/p-TSA particles in suspensions in time zero (t = 0 h) (C) and 24 h (t = 24 h) (D). DLS size distribution (E) and average particle size (Z-average) (F) of PPy/p-TSA suspensions in t = 0 h and t = 24 h (mean ± standard deviation; n = 3). ***p < 0.001 significantly different from vehicle group (One-way ANOVA followed by Bonferroni's test). UV–vis: Ultraviolet–visible; DLS: Dynamic Light Scattering.

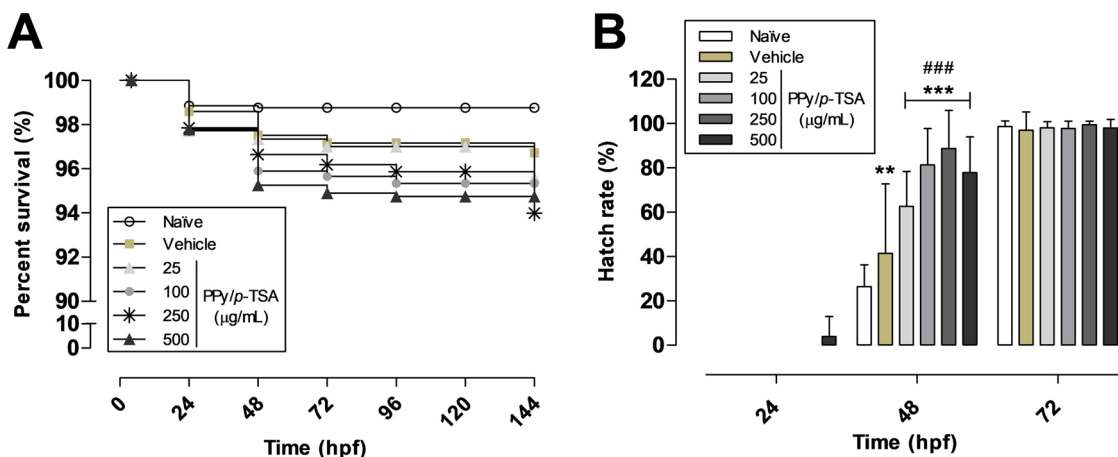


Fig. 4. Zebrafish survival and hatching during PPy/p-TSA exposure. The survival (A) and hatching rate (B) over 6 days of exposure (from 4 to 144 hpf, n = 210/group). Survival was estimated according to the Kaplan-Meier method. Error bars in column graph represent standard deviation. **p < 0.01 and ***p < 0.001 significantly different from naïve group; ###p < 0.001 significantly different from vehicle group (Two-way ANOVA plus Bonferroni's test).

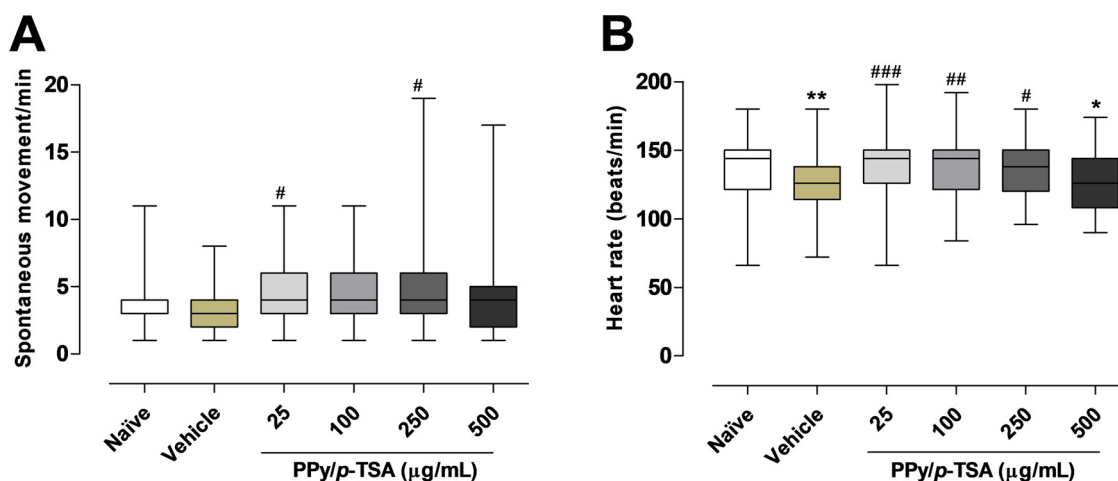


Fig. 5. Effects of PPy/*p*-TSA exposure on zebrafish embryos. Spontaneous movement at 24 hpf (A), and heart rate measurement at 48 hpf (B) ($n = 80$ /group). Box-plots errors bars represent the range of variation (from min to max). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significantly different from naïve group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ significantly different from vehicle group (Kruskal-Wallis plus Dunn's test).

higher concentrations of PPy/*p*-TSA.

All experimental groups were also analyzed by ATR-FTIR spectroscopy in order to investigate, at the molecular level, the interaction of the chorion with PPy/*p*-TSA. The spectral profiles were obtained directly from the biological material of the control (naïve and vehicle) and treated groups (25, 100, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$) at 24 and 48 hpf. In the experimental groups treated at the concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$, the occurrence of bands at 1204 and 927 cm^{-1} indicated the presence of sulfonate groups (Fig. S1), relating to the state of PPy doped with *p*-toluene sulfonic acid [32,35] (Fig. S2). These vibrational bands characteristic of PPy/*p*-TSA could be observed at higher intensity in the 250 $\mu\text{g/mL}$ -exposed groups at 48 h due to the aggregation of the particles on the surface of the chorion (Fig. S1). Additionally, gene expression analyses of the hypoxia-associated marker HIF-1 α was performed in 48 hpf embryo exposed to PPy/*p*-TSA (Fig. S3). No changes in *hif1- α* mRNA levels were found.

3.4. PPy/*p*-TSA effects on larval morphology

Morphological changes were observed 120 hpf larvae. A reduction of 3.1%; 4.7% and 4.3% in body length (Fig. 7A) was seen in the 100, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ -exposed groups, respectively, in comparison with the naïve group. A slight reduction (2.9%) in body length was also identified in the 250 $\mu\text{g/mL}$ -exposed group against the vehicle group. The ocular distance (Fig. 7B) increased by 3.4%, 5.1% and 4.3% in the 100, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ -exposed groups, respectively, in comparison with the naïve group. Interestingly, none of these groups showed significant differences in ocular surface area, despite a tendency in exposed groups (Fig. 7C).

3.5. PPy/*p*-TSA effects on larval behavior

At 144 hpf, zebrafish larvae with no visual malformations were recorded and submitted to a locomotor behavior assay, to determine whether PPy/*p*-TSA exposure led to locomotor impairment (Fig. 8). Larval locomotor activity evaluation showed an increase in the absolute turn angle in the vehicle group in comparison with the naïve group, and a decrease in the 25 $\mu\text{g/mL}$ -exposed group when compared to the vehicle group (Fig. 8B). The 100 $\mu\text{g/mL}$ -exposed group showed an increase in the absolute turn angle and time in the center, and a decrease in the latency to enter the center and the time spent in the periphery when compared to the naïve group (Fig. 8B, G, I and J, respectively). In relation to the mean meander, this presented a decrease in comparison with the naïve and vehicle groups, while mean velocity and

acceleration showed a decrease in comparison with the vehicle group (Fig. 8C, E and F, respectively).

At the higher concentrations, the 250 $\mu\text{g/mL}$ -exposed group showed an increase in the absolute turn angle in comparison with the naïve group and a decrease in distance travelled and mean velocity when compared to the vehicle group (Fig. 8B, D and E, respectively). The parameters mean meander, acceleration and time in the periphery were decreased, while an increase in the time in the center was observed compared to the naïve and vehicle groups (Fig. 8C, F and J, respectively). The 500 $\mu\text{g/mL}$ -exposed group presented an increase in the absolute turn angle, the number of entries into the center and the number of entries into the periphery in comparison with the naïve group, although the mean meander and acceleration were decreased in comparison with the naïve and vehicle groups, respectively (Fig. 8B, H, K, C and F, respectively). Other parameters evaluated such as distance, mean velocity and time in periphery were decreased, while the time in the center was increased in relation to the naïve and vehicle groups (Fig. 8D, E, J, and G, respectively). The latency to enter the periphery did not show significant differences in any of the groups (Fig. 8L).

4. Discussion

With the exponential increase in the use of nanotechnology in the biomedical field, PPy has drawn attention due to its surface properties and synthesis versatility; however, its non-biodegradability represents a major challenge to its use in nanomedicine [3]. There is little information concerning the potential adverse effects of PPy nanoparticles, since PPy can affect biokinetics and induce oxidative stress and inflammation in biological systems, triggering potential toxic responses in mammalian cells [10]. Based on previous reports, the PPy particle size, shape and concentration are determinant of the cytotoxic effects in *in vitro* systems [10,11].

The methodological conditions used to produce a polymer affect the final particle size [10,11,32–34]. As nanoparticles, they have an intrinsic tendency to agglomerate due to their high superficial area through electrostatic interactions and van der Waals forces [36]. It has been reported that, during PPy synthesis, smaller particles can aggregate, creating structures with different sizes and shapes, including spherical dense or hollow structures [36,37]. In our study, the TEM and MEV images (Fig. 2A–C) showed small dense spherical particles and larger aggregates. These differences in size were consistent with the DLS findings, showing two main size ranges (Fig. 3C–F), which also corroborates with previous data, despite differences in PPy synthesis methods [36].

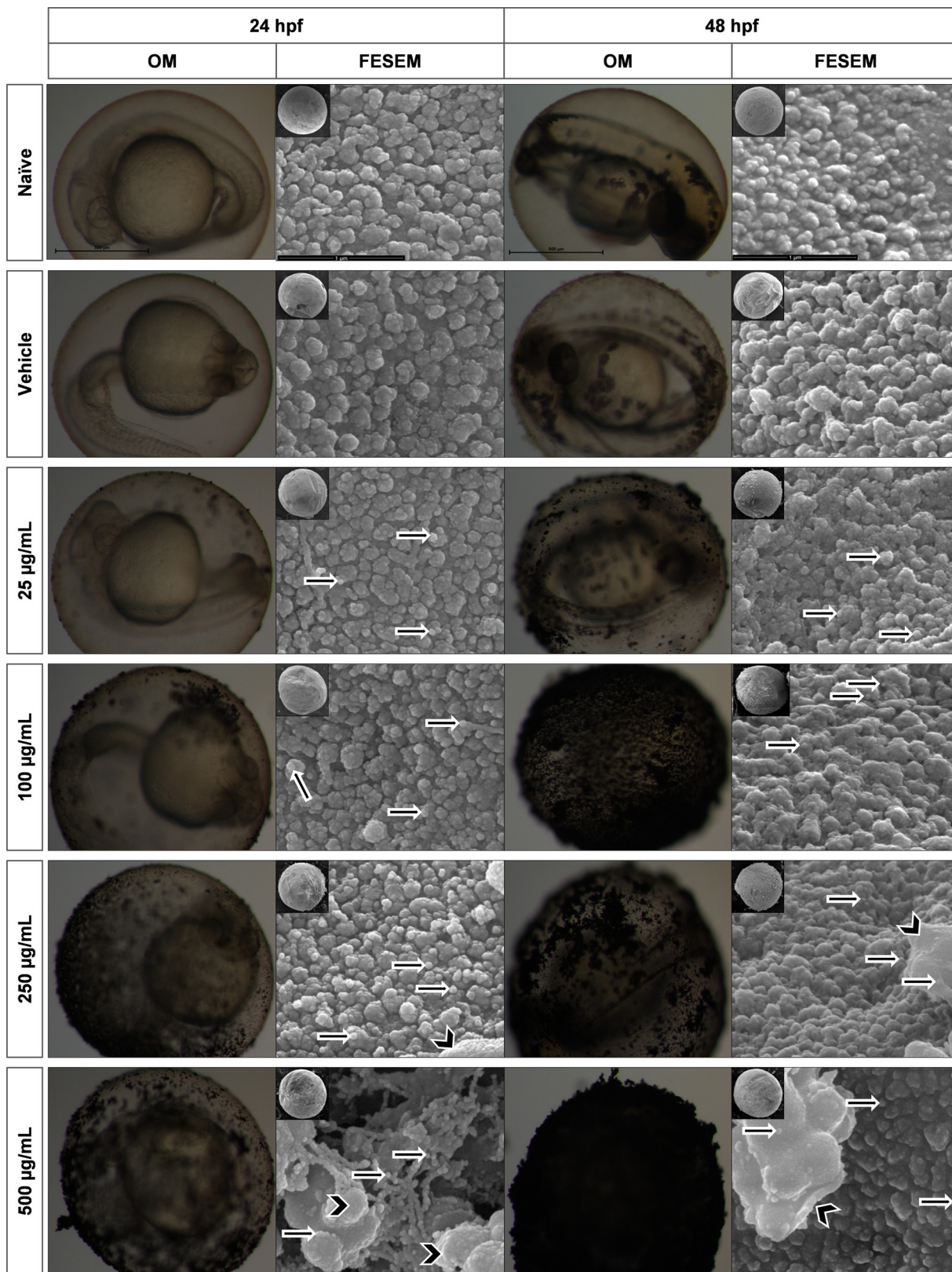


Fig. 6. PPy/p-TSA deposition on zebrafish embryo chorion. Representative OM and FESEM images of zebrafish embryos at 24 hpf and 48 hpf. Arrows indicate PPy/p-TSA deposition on the surface of the chorion, and triangular arrows indicate bacterial-like morphology ($n = 15/\text{group}$). Scale bar (in control group) in OM = 500 μm , and in FESEM = 1 μm . OM: optical microscopy; FESEM: Field-Emission Scanning Electron Microscopy.

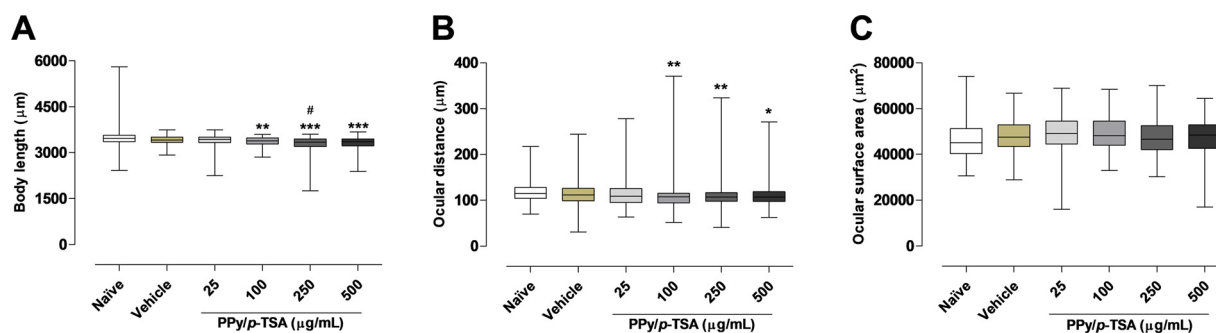


Fig. 7. Effects of PPy/p-TSA exposure on larval morphology. Body length (A), ocular distance (B) and ocular surface area (C) at 120 hpf ($n = 100/\text{group}$). Box-plots errors bars represent the range of variation (from min to max). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different from naïve group; # $p < 0.05$ significantly different from vehicle group (Kruskal-Wallis plus Dunn's test).

Despite the hydrophobic features of PPy, their insolubility in common solvents, including water, complicates their use [38]; to minimize this, surfactant dopants are used during synthesis [32,33,39]. Among the different dopants reported to successfully integrate into PPy, *para*-toluene sulfonate (pTS) and dodecylbenzenesulfonate (DBS) have shown favorable biocompatibility in cell culture [39,40]. In order to improve our understanding of PPy biocompatibility, here, PPy nanoparticles were prepared through oxidative polymerization in the presence of an anionic surfactant (p-TSA) that is commonly used to synthesize this nanoparticle. Besides the use of a dopant during PPy polymerization, a non-ionic surfactant was employed as a suspension dispersant. The dispersant Pluronic® F 68 (PF68) was used at a concentration of 1% for all doses, to improve the homogeneity, dispersion and stability of insoluble particles in system water [2]. PPy/p-TSA suspensions at higher concentrations showed less stability, favoring larger agglomerates and facilitating nanomaterial precipitation (Fig. 3A–B), which corroborates previous data [35]. However, after 24 h, independent of the initial concentration, all the samples presented similarly sized particles in suspension, i.e. below 1500 nm (Fig. 3C–F). Although a high amount of aggregates was identified within the first half of the exposure period, this amount was consistently maintained over the second half. Indeed, aggregation and sedimentation of different nanoparticles in water have been reported with zebrafish exposure, e.g. MWNTs and GO nanoparticles, also using a 24 h time point for water exchange [21,22].

The results demonstrate that PPy/p-TSA nanoparticles had no significant effect on fish mortality (Fig. 4A). Regarding the hatching rate analysis (Fig. 4B), the data show that embryos exposed to PF68 1% presented early hatching in comparison with the naïve group. However, embryos also exposed to PPy/p-TSA exhibited even more hatching at 48 hpf. Furthermore, the 500 µg/mL-exposed group showed even sooner hatching, at 24 hpf (Fig. 4B). Although zebrafish embryos normally hatch between 48–72 hpf [41], animals exposed to PPy/p-TSA showed early hatching, dose-dependently, which has not been seen in other experiments using zebrafish and carbon-based nanomaterials [22,23].

The embryos exposed to 25, 100 and 250 µg/mL of PPy/p-TSA presented a significant increase in heart rate when compared to vehicle-exposed embryos (Fig. 5B). The 500 µg/mL-exposed group showed a slight decrease in heart rate in comparison with naïve embryos (Fig. 5B). Several studies using carbon-based materials have shown cardiac dysfunction as a result of nanomaterial exposure in zebrafish embryos [23,42,43]. Permeability through the chorion microstructure and the potential toxicity of nanoparticles can vary based on their properties, such size and surface coating [44]. The zebrafish chorion is an acellular envelope that protects and surrounds the embryo until 48–72 hpf, with a pore diameter of 0.5–0.7 µm, 1.5–2.0 µm apart from each other, which allows for the exchange of gases, filtration and protection against microorganisms [45]. The pore size and the structural

organization of the chorion allow some nanomaterials to enter the egg by passive diffusion, reaching the embryo [46]; however, it is still unclear if nanoparticles have specific interactions with the chorion itself [47]. In the present study, we evaluated the possible interaction between PPy/p-TSA and the embryo chorion by OM and FESEM (Fig. 6) for the first time. PPy/p-TSA-exposed embryos chorions presented agglomerates in large clusters, building a dense PPy/p-TSA layer covering the whole egg. FESEM observations revealed that the chorions of PPy/p-TSA-exposed zebrafish embryos showed particulate deposition in all concentrations; however, aggregates of random sizes were more abundant in the higher concentration groups. The pore size was sufficiently large to allow PPy/p-TSA nanoparticles to enter the chorionic sac. Given the granular morphology of particles with irregular spheres shown in the TEM images and the particulate size range of 23 to 896 nm, PPy/p-TSA most likely entered the chorion through these pores, thereby crossing a biological membrane; however, the mechanism of interaction between PPy/p-TSA and zebrafish chorion is still unknown. The size dependence of cellular uptake via endocytosis and phagocytosis *in vitro* [10], concentration-dependent cytotoxicity [11] and antibacterial efficacy [48] have been observed for PPy. Indeed, our FESEM images show an increase in bacteria-like morphologies in the exposed groups with higher concentrations of PPy/p-TSA. The pro- or anti-bacterial capacity of PPy may be linked to various interventions during PPy preparation, such as the method of synthesis, the doping agent used as well as washing and storage conditions [48,49].

The ATR-FTIR technique was used to improve our chemical understanding of the PPy/p-TSA-related interaction with the surface of the embryo chorion. The spectra obtained from treated groups did not highlight any change within characteristic functional groups on phospholipids or proteins [50] related to the embryo chorion when exposed to PPy/p-TSA. Furthermore, in animals exposed to a higher concentration (500 µg/mL at 24 hpf) and/or longer exposure (250 µg/mL at 48 hpf), the characteristic bands of PPy/p-TSA were observed at 1204 cm^{-1} and 927 cm^{-1} , reinforcing the presence of PPy/p-TSA in the zebrafish embryos chorion (Fig. S1).

With the layer of the PPy/p-TSA particulates observed around the zebrafish chorion (Fig. 6) and the premature hatching (Fig. 4B) of PPy/p-TSA-exposed groups, we hypothesized that the embryos could have been under hypoxic conditions. Hypoxia inducible transcription factor 1 (*hif-1*) is associated with the short-term response to low oxygen, and acts as an oxygen sensor in the cytoplasm. It is constitutively expressed in vertebrates [51] and is expressed in zebrafish embryos during development [52]. Therefore, we assayed mRNA levels of *hif1- α* after 48 h of PPy/p-TSA exposure; there were no significant changes among groups (Fig. S3). This result by itself does not exclude hypoxia, since *hif1- α* has also been reported as a limited hypoxia biomarker in embryos [53], with time- and tissue-specific gene expression [54].

Some nanomaterials have been reported to affect zebrafish embryogenesis [55], and dysfunctional embryogenesis might be associated

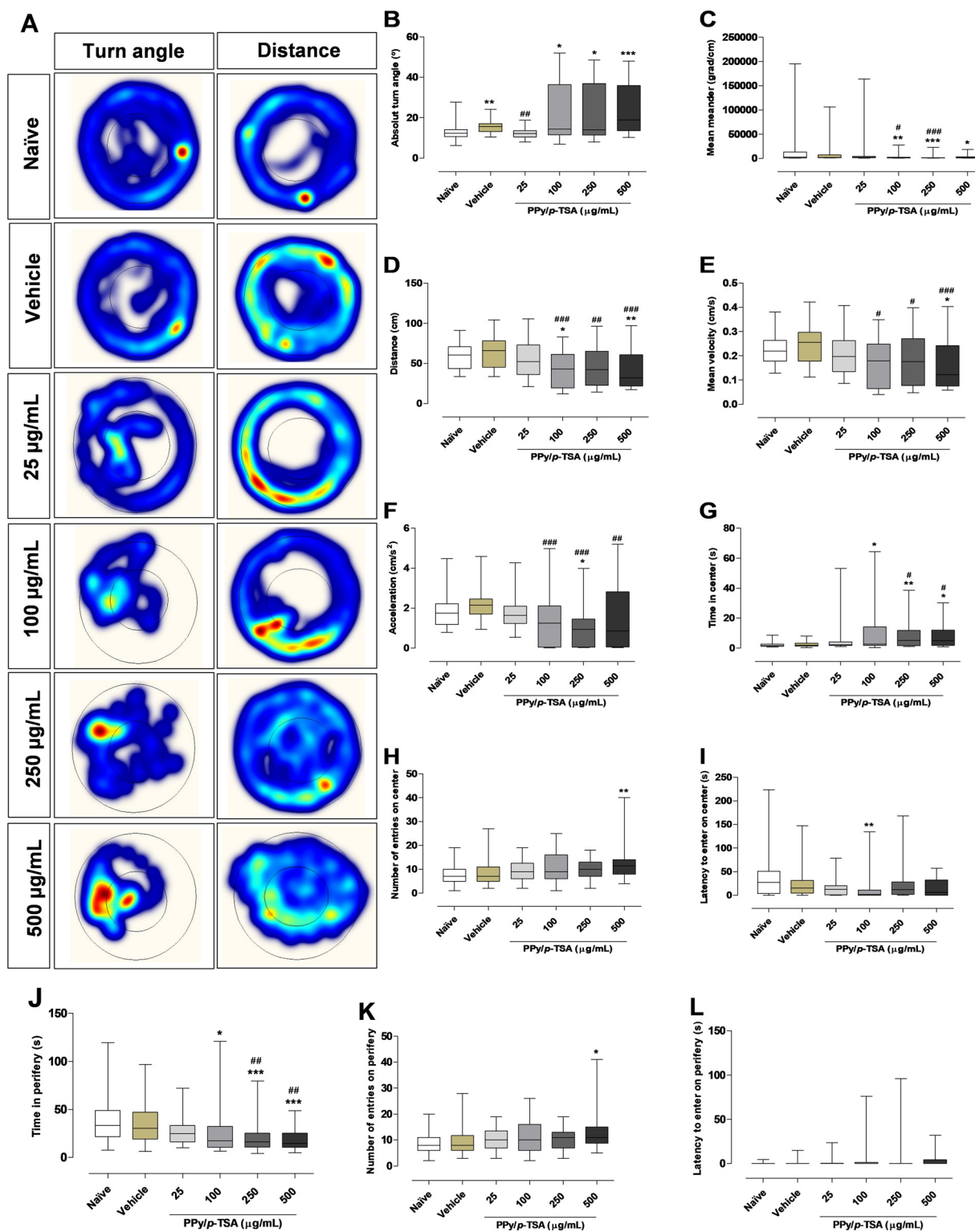


Fig. 8. Effects of PPy/p-TSA on larval locomotor activity. Representative absolute turn angle heatmaps and distance (A), absolute turn angle (B), mean meander (C), distance travelled (D), mean velocity (E), acceleration (F), time in center (G), number of entries on center (H), latency to enter on center (I), time in periphery (J), number of entries on periphery (K) and latency to enter on periphery (L) at 144 hpf (> 33 animals/group). Box-plots errors bars represent the range of variation (from min to max). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different from naïve group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ significantly different from vehicle group (Kruskal-Wallis plus Dunn's test).

with oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS), developmental outcomes and mortality [56]. For this reason, the developmental malformation of zebrafish embryo tissues is considered another significant endpoint for nanoparticle toxicity screening [15]. PPy/p-TSA exposure had important effects on two of three

morphological parameters analyzed at 120 hpf. Larvae exposed to higher concentration of PPy/p-TSA showed a non-lethal reduction in body length (Fig. 7A), consistent with previous reports on carbon-based nanomaterials, in a dose-dependent manner [22,43]. In addition, the same groups that presented axial length reduction also had relevant

alterations in ocular distance (Fig. 7B), which have been reported for other carbon-based nanomaterials, such as MWCNTs, resulting in smaller eyes [57].

The zebrafish behavioral response has become an important tool for screening chemicals as locomotor behavior changes can be a sensitive indicator of toxicity [15,31]. Fig. 8 shows that 10 out of 11 behavioral parameters analyzed exhibited significant differences between PPy/p-TSA-exposed fish compared to the naïve and/or vehicle groups. Animals exposed to the highest concentrations showed consistently decreased in locomotor-associated parameters such as distance traveled, mean velocity and acceleration, especially when compared to the vehicle group (Fig. 8D–F). Higher concentrations of PPy/p-TSA were also associated with decreased mean meander and an increased turn angle, which indicates an altered swimming pattern; meandering evaluates the movements without a fixed direction or path [58] and turn angle is a sensitive measure of motor coordination [59]. Exploratory-like behavioral parameters (associated with latency to enter the center zone, the number of entering events and time spent in the center or periphery zones) did not show differences among the groups (Fig. 8G–L). Taken together, these results indicate a less active state in animals exposed to the highest concentration of PPy/p-TSA, consistent with hypolocomotor behavior, which has been previously related to neuromotor deficits and akinesia in zebrafish [60]. The animals exposed to the lowest concentration of PPy/p-TSA, however, were not significantly affected. Although limited data are available regarding the behavioral effects of nanomaterials on zebrafish = [22,31], PPy/p-TSA exposure during embryonic and larval development, under the conditions described here, has important effects on zebrafish larval locomotor activity, a sensitive parameter of toxicity.

5. Conclusions

Our findings demonstrate that PPy/p-TSA exposure in zebrafish larvae during six consecutive days did not lead to significant decrease in survival, but led to premature hatching in exposed groups. We suggest a biological affinity between PPy/p-TSA and the embryo chorion, as particles of this size were able to penetrate through the chorion, to reach the embryo and to promote embryonic toxicity, which did not seem to be related to hypoxia-marker *hif1- α* , at least at the mRNA level. These effects were also reflected in a reduction in the heart rate of embryos treated at the highest concentration, as well as in morphological and locomotor parameters, which indicates hypoactivity behavior. This work explored the potential adverse effects of PPy/p-TSA exposure during zebrafish embryogenesis and suggests that some caution should be employed to ensure its potential use in nanomedicine.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

The authors thank Wagner Prates and Elisa Magno Nunes de Oliveira for technical assistance.

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) [grant number 17/2551-0001060-4]; the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Neurotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN) [grant number 465671/2014-4]; the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) [grant number “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRS-INFRA)#01.11.0014-00] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. P.M, N.R.B and M.R.B are Research Career Awardees of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.041>.

References

- [1] R. Balint, N.J. Cassidy, S.H. Cartmill, Conductive polymers: towards a smart bio-material for tissue engineering, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2341–2353, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>.
- [2] J.M. Ribo, C. Acero, M.C. Anglada, A. Dicko, On the structure and transport properties of polypyrroles, *Bull. Soc. Cat. Cien.* v13, (1992).
- [3] J. Xie, M.R. Macewan, S.M. Willerth, X. Li, D.W. Moran, S.E. Sakiyama-Elbert, Y. Xia, Conductive core-sheath nanofibers and their potential application in neural tissue engineering, *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 2312–2318, <https://doi.org/10.1002/adfm.200801904>.
- [4] X. Wang, X. Gu, C. Yuan, S. Chen, P. Zhang, T. Zhang, J. Yao, F. Chen, G. Chen, Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. A* 68 (2004) 411–422, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20065>.
- [5] H. Zhang, K. Wang, Y. Xing, Q. Yu, Lysine-doped polypyrrole/spider silk protein/poly(L-lactic) acid containing nerve growth factor composite fibers for neural application, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 56 (2015) 564–573, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.024>.
- [6] A. Vaitkuviene, V. Ratautaite, L. Mikoliunaite, V. Kaseta, G. Ramanauskaite, G. Bizileviene, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Some biocompatibility aspects of conducting polymer polypyrrole evaluated with bone marrow-derived stem cells, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 442 (2014) 152–156, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.06.030>.
- [7] D. Esrafilzadeh, J.M. Razal, S.E. Moulton, E.M. Stewart, G.G. Wallace, Multifunctional conducting fibres with electrically controlled release of ciprofloxacin, *J. Control. Release* 169 (2013) 313–320, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.022>.
- [8] C. Ungureanu, S. Popescu, G. Purcel, V. Tofan, M. Popescu, A. Salageanu, C. Pirvu, Improved antibacterial behavior of titanium surface with torularhodin-polypyrrole film, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 42 (2014) 726–733, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.020>.
- [9] S. Quignard, G. Mosser, M. Boissière, T. Coradin, Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts, *Biomaterials* 33 (2012) 4431–4442, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.004>.
- [10] S. Kim, W.K. Oh, Y.S. Jeong, J.Y. Hong, B.R. Cho, J.S. Hahn, Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells, *Biomaterials* 32 (2011) 2342–2350, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.080>.
- [11] A. Vaitkuviene, V. Kaseta, J. Voronovic, G. Ramanauskaite, G. Bizileviene, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization, *J. Hazard. Mater.* 250–251 (2013) 167–174, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.038>.
- [12] A. Ramanaviciene, A. Kausaite, S. Tautkus, A. Ramanavicius, Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 311–315, <https://doi.org/10.1211/jpp.59.2.0017>.
- [13] G. Oberdörster, Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology, *J. Intern. Med.* 267 (2010) 89–105, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x>.
- [14] A.D. Maynard, D.B. Warheit, M.A. Philbert, The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond, *Toxicol. Sci.* 120 (Suppl 1) (2011) S109–S129, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq372>.
- [15] C. Chakraborty, A.R. Sharma, G. Sharma, S.S. Lee, Zebrafish: a complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity, *J. Nanobiotechnol.* 14 (2016) 65, <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6>.
- [16] C. Medina, M.J. Santos-Martinez, A. Radomski, O.I. Corrigan, M.W. Radomski, Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, *Br. J. Pharmacol.* 150 (2007) 552–558, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707130>.
- [17] G.J. Lieschke, P.D. Currie, Animal models of human disease: zebrafish swim into view, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 353–367, <https://doi.org/10.1038/nrg2091>.
- [18] C. Chakraborty, G. Agoramoorthy, Why zebrafish? *Riv. Biol.* 103 (2010) 25–27 PMID: 21110461.
- [19] W.S. Redfern, G. Waldron, M.J. Winter, P. Butler, M. Holbrook, R. Wallis, J.P. Valentin, Zebrafish assays as early safety pharmacology screens: paradigm shift or red herring? *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 58 (2008) 110–117, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.05.006>.
- [20] J.S. Filho, E.Y. Matsubara, L.P. Franchi, I.P. Martins, L.M.R. Rivera, J.M. Rosolen, C.K. Grisolia, Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (Danio rerio) model, *Environ. Res.* 134 (2014) 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.06.017>.
- [21] L.M. Gilbertson, F. Melnikov, L.C. Wehmas, P.T. Anastas, R.L. Tanguay, J.B. Zimmerman, Toward safer multi-walled carbon nanotube design: establishing a statistical model that relates surface charge and embryonic zebrafish mortality, *Nanotoxicology* 10 (2016) 10–19, <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.996193>.
- [22] J. Soares, T. Pereira, K. Costa, T. Maraschin, N. Basso, M. Bogo, Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (Danio rerio), *Colloids Surf. B Biointerfaces* 157 (2016) 335–346, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.078>.
- [23] Y. Chen, X. Hu, J. Sun, Q. Zhou, Specific nanotoxicity of graphene oxide during

- zebrafish embryogenesis, *Nanotoxicology* 10 (2015) 42–52, <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1005032>.
- [24] C.Y. Usenko, S.L. Harper, R.L. Tanguay, In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish, *Carbon N. Y.* 45 (2007) 1891–1898, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.04.021>.
- [25] G.O. Dal Forno, L.W. Kist, M.B. Azevedo, R.S. Fritsch, T.C.B. Pereira, R.S. Britto, S.S. Guterres, I.C. Küllamp-Guerreiro, C.D. Bonan, J.M. Monserrat, M.R. Bogo, Intra-peritoneal exposure to Nano/Microparticles of fullerene (C60) increases acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Biomed Res. Int.* (2013) 1–11, <https://doi.org/10.1155/2013/623789>.
- [26] S. Altenhofen, D.D. Nabinger, M.T. Wiprich, T.C.B. Pereira, M.R. Bogo, C.D. Bonan, Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere* 180 (2017) 483–490, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.029>.
- [27] A.H. Lutte, K.M. Capiotti, N.L. Silva, C.S. Silva, L.W. Kist, M.R. Bogo, R.S. Silva, Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae, *Reprod. Toxicol.* 53 (2015) 82–91, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.04.001>.
- [28] R.M. Colwill, R. Creton, Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae, *Behav. Processes* 86 (2011) 222–229, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.12.003>.
- [29] L.R. Nery, N.S. Eltz, C. Hackman, R. Fonseca, S. Altenhofen, H.N. Guerra, V.M. Freitas, C.D. Bonan, M.R.M.R. Vianna, Brain intraventricular injection of Amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by Lithium, *PLoS One* 9 (2014) e105862, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105862>.
- [30] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- [31] G.M.T. Oliveira, E.M.N. Oliveira, T.C.B. Pereira, R.M. Papaléo, M.R. Bogo, Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish, *J. Nanopart. Res.* 19 (2017) 389, <https://doi.org/10.1007/s11051-017-4074-5>.
- [32] S. Goel, N.A. Mazumdar, A. Gupta, Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants, *Polym. Adv. Technol.* 21 (2010) 205–210, <https://doi.org/10.1002/pat.1417>.
- [33] A. Reung-U-Rai, A. Prom-Jun, W. Prissanaroon-Ouajai, S. Ouajai, Synthesis of highly conductive polypyrrole nanoparticles via microemulsion polymerization, *J. Met. Mater. Miner.* 18 (2008) 27–31.
- [34] X. Xia, J. Yin, P. Qiang, X. Zhao, Electro-rheological properties of thermo-oxidative polypyrrole nanofibers, *Polymer* 52 (2011) 786–792, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.12.018>.
- [35] M.B. Runge, M. Dadsetan, J. Baltrusaitis, A.M. Knight, T. Ruesink, E.A. Lazcano, L. Lu, A.J. Windebank, M.J. Yaszemski, The development of electrically conductive polycaprolactone fumarate-polypyrrole composite materials for nerve regeneration, *Biomaterials* 31 (2010) 5916–5926, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.012>.
- [36] K. Leonavicius, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Polymerization model for hydrogen peroxide initiated synthesis of polypyrrole nanoparticles, *Langmuir* 17 (2011) 10970–10976, <https://doi.org/10.1021/la201962a>.
- [37] A. Stirke, R.M. Apetrei, M. Kirsnyte, L. Dedelaite, V. Bondarenka, V. Jasulaitiene, M. Pucetaite, A. Selskis, G. Carac, G. Bahrim, A. Ramanavicius, Synthesis of polypyrrole microspheres by *Streptomyces* spp, *Polymer* 84 (2016) 99–106, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.12.029>.
- [38] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 237–280, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>.
- [39] A. Fahlgren, C. Bratengeier, A. Gelmi, C.M. Semeins, J. Klein-Nulend, E.W.H. Jager, A.D. Bakker, Biocompatibility of polypyrrole with human primary osteoblasts and the effect of dopants, *PLoS One* 10 (2015) e0134023, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134023>.
- [40] B.C. Thompson, S.E. Moulton, R.T. Richardson, G.G. Wallace, Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein, *Biomaterials* 32 (2011) 3822–3831, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.053>.
- [41] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev. Dyn.* 203 (1995) 253–310, <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- [42] M. d'Amora, A. Camisasca, S. Lettieri, S. Giordani, Toxicity assessment of carbon nanomaterials in zebrafish during development, *Nanomaterials* 7 (2017) 414, <https://doi.org/10.3390/nano7120414>.
- [43] X.T. Liu, X.Y. Mu, X.L. Wu, L.X. Meng, W.B. Guan, Y.Q. Ma, H. Sun, C.J. Wang, X.F. Li, Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos, *Biomed. Environ. Sci.* 27 (2014) 676–683, <https://doi.org/10.3967/bes2014.103>.
- [44] K.T. Kim, R.L. Tanguay, The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay, *Environ. Health Toxicol.* 29 (2014) e2014021, <https://doi.org/10.5620/eht.e2014021>.
- [45] D.M. Rawson, T. Zhang, D. Kalicharan, W.L. Jongebloed, Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration, *Aquac. Res.* 31 (2000) 325–336, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00401.x>.
- [46] K.J. Lee, P.D. Nallathambiy, L.M. Browning, C.J. Osgood, X.H.N. Xu, In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos, *ACS Nano* 1 (2007) 133–143, <https://doi.org/10.1021/nn700048y>.
- [47] V.E. Fako, D.Y. Furgeson, Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 478–486, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.008>.
- [48] A. Varesano, C. Vineis, A. Aluigi, F. Rombaldoni, C. Tonetti, G. Mazzuchetti, Antibacterial efficacy of polypyrrole in textile applications, *Fibers Polym.* 14 (2013) 36–42, <https://doi.org/10.1007/s12221-013-0036-4>.
- [49] S.M. Sayyah, F. Mohamed, M. Shaban, Antibacterial activity of nano fabricated polypyrrole by cyclic voltammetry, *IOSR J. Appl. Chem.* 7 (2014) 11–15, <https://doi.org/10.9790/5736-07211115>.
- [50] E. Giorgini, G. Gioacchini, S. Sabbatini, C. Conti, L. Vaccari, A. Borini, O. Carnevali, G. Tosi, Vibrational characterization of female gametes: a comparative study, *Analyst* 139 (2014) 5049–5060, <https://doi.org/10.1039/c4an00684d>.
- [51] Q. Ke, M. Costa, Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1), *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 1469–1480, <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>.
- [52] D.A. Rojas, D.A. Perez-Munizaga, L. Centanin, M. Antonelli, P. Wappner, M.L. Allende, A.E. Reyes, Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish, *Gene Expr. Patterns* 7 (2007) 339–345, <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.08.002>.
- [53] A. McElroy, C. Clark, T. Duffy, B. Cheng, J. Gondek, M. Fast, K. Cooper, L. White, Interactions between hypoxia and sewage-derived contaminants on gene expression in fish embryos, *Aquat. Toxicol.* 108 (2012) 60–69, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.017>.
- [54] Z. Zhang, Z. Ju, M.C. Wells, R.B. Walter, Genomic approaches in the identification of hypoxia biomarkers in model fish species, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 381 (2009) S180–S187, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.07.021>.
- [55] K.J. Ong, X. Zhao, M.E. Thistle, T.J. MacCormack, R.J. Clark, G. Ma, Y. Martinez-Rubi, B. Simard, J.S. Loo, J.G. Veinot, G.G. Goss, Mechanistic insights into the effect of nanoparticles on zebrafish hatch, *Nanotoxicology* 8 (2014) 295–304, <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.778345>.
- [56] Y. Chen, C. Ren, S. Ouyang, X. Hu, Q. Zhou, Mitigation in multiple effects of graphene oxide toxicity in zebrafish embryogenesis driven by humic acid, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 10147–10154, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02220>.
- [57] J. Cheng, S.H. Cheng, Influence of carbon nanotube length on toxicity to zebrafish embryos, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 3731–3739, <https://doi.org/10.2147/IJN.S30459>.
- [58] J. Cachat, A. Stewart, E. Utterback, P. Hart, S. Gaikwad, K. Wong, E. Kyzar, N. Wu, A.V. Kalueff, Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior, *PLoS One* 6 (2011) e17597, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017597>.
- [59] A.R. Blazina, M.R. Vianna, D.R. Lara, The spinning task: a new protocol to easily assess motor coordination and resistance in zebrafish, *Zebrafish* 10 (2013) 480–485, <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0860>.
- [60] A.V. Kalueff, M. Gebhardt, A.M. Stewart, J.M. Cachat, M. Brimmer, J.S. Chawla, C. Craddock, E.J. Kyzar, A. Roth, S. Landsman, S. Gaikwad, K. Robinson, E. Baatrup, K. Tierney, A. Shamchuk, W. Norton, M. Miller, T. Nicolson, O. Braubach, C.P. Gilman, J. Pittman, D.B. Rosemberg, R. Gerlai, D. Echevarria, E. Lamb, S.C. Neuhauss, W. Weng, L. Bally-Cuif, H. Schneider, Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond, *Zebrafish* 10 (2013) 70–86, <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>.

Supplementary Material

Adverse effects of *p*-TSA-doped polypyrrole particulate exposure in zebrafish (*Danio rerio*) development

Kesiane M. Costa^{1,2}, Talita C. B. Pereira^{1,3*}, Cristhiane A. Valente^{4,5}, Kenia Pissinate⁶, Jéssica C. Soares^{1,3}, Fernanda F. Cruz³, Temis W. F. Corte⁷, Pablo Machado^{3,6}, Nara R. S. Basso^{4,5} and Maurício R. Bogo^{1,2,3,*}

¹Laboratory of Genomics and Molecular Biology, School of Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

²Graduate Program in Medicine and Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

³Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Organometallic Compounds and Resins Laboratory, School of Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Graduate Program in Materials Engineering and Technology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶National Institute of Science and Technology in Tuberculosis, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁷Cosmetology Laboratory, School of Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

*Author correspondence: Laboratory of Genomics and Molecular Biology, School of Sciences, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12C – sala 134, CEP: 90619-900 - Porto Alegre – RS/Brazil, Fone: +55 51 3353-4726. E-mail addresses: mbogo@pucrs.br (M.R. Bogo), talitapereira@gmail.com (T.C.B. Pereira).

PPy/*p*-TSA synthesis

Pyrrrole (Py) (Sigma-Aldrich, 98%) was purified by distillation before polymerization. All other chemicals were used without further purification. Doped polypyrrole (PPy) was synthesized by oxidative polymerization method using *p*-toluene

sulfonic acid (*p*-TSA, Sigma-Aldrich) as dopant and ferric chloride (FeCl₃, Sigma-Aldrich) as oxidants, adapted from literature [1], hereinafter, labeled as PPy/*p*-TSA. In a typical polymerization reaction, Py (7.2 mmol) and *p*-TSA (32 mmol) were added to 20 mL of deionized water and left under stirring for one hour at 25 °C. Then, 5 ml of FeCl₃ (12.3 mmol) aqueous solution was added drop wise to the solution. The reaction occurred at 25 °C with constant stirring for 24 h. The PPy/*p*-TSA nanoparticles formed were filtered, washed several times with distilled water and ethanol until washing liquid reaches the same pH value of the distilled water. The final product was dried for 8 h at 80 °C and stored in a desiccator with silica.

The morphology of the PPy/*p*-TSA was examined using Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM, Inspect F50, FEI Company). The samples in powder form were metalized with gold. Surface composition was characterized by Energy-Dispersive-X-ray spectroscopy (EDS) using a TEAM™ EDS Analysis System for the Scanning Electron Microscopy (SEM) equipped with Apollo Silicon Drift Detector (SDD) from EDAX® products. The Transmission Electron Microscopy (TEM) images were obtained using a Tecnai G2 T20 equipment (FEI Company) operate at 20 kV. All samples were prepared by deposition of an acetone solution drop in copper grid covered with ultrathin amorphous carbon film.

The absorption spectra in the infrared region in the KBr pellets were examined using Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR, Perkin Elmer - Spectrum One) in the range 400–4000 cm⁻¹ at 4 cm⁻¹ resolutions. The electrical conductivity was determined by the four-point probe method (Keithley Instruments, model 236, and Multimeter HP34401) on pellet (13.4 mm diameter, <1 mm thick) prepared by compacting the PPy/*p*-TSA powder. The particle size was estimated from FESEM and analyzed using NIH ImageJ 1.36b Software for treatment and measurement of the

particles randomly. In order to represent the distribution of PPy/*p*-TSA particles diameter 880 measures were collected from seven different images of FESEM.

Preparation and characterization of PPy/*p*-TSA suspensions

PPy/*p*-TSA was dispersed in 1% Pluronic® F 68 (PF68, Sigma-Aldrich) aqueous solution by sonication in ultrasonic bath (40 kHz/60 W) during one hour and left under stirring overnight. PPy/*p*-TSA suspensions with 25, 100, 250 and 500 µg/mL [2] were daily prepared using water from zebrafish re-circulating system (Zebtec, Tecniplast). Fish system water with and without 1% PF68 were used as controls (naïve and vehicle groups, respectively); both submitted to the same process of previous suspensions. Conductivity and pH were monitored daily, before and after exposure, and maintained at 300–1500 µS/cm and 6.8–8.5, respectively [3].

To evaluate PPy/*p*-TSA suspensions stability, absorbance at 260 nm was monitored in each concentration over 24 h, through UV-visible Spectroscopy System [4] (UV-Vis, Agilent 8453, Hewlett Packard). Dynamic Light Scattering (DLS) was performed by Zetasizer (ZEN3600, Malvern Instruments Ltd) in order to estimate particles average size in suspension. The size measurement was determined by the average of three independent readings, each one obtained from the average of 15 counts performed by the equipment during the DLS analysis. The data was presented in both logarithmic scale and size distribution range in zero time (t=0 h) and 24 h (t=24 h).

Zebrafish use and maintenance: *In vivo* exposure and toxicological endpoints

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from our breeding colony and maintained in automated recirculating system, using default conditions of

temperature ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), pH (6.8-8.5) and light/dark cycle of 14/10 h [3]. Fish were fed three times a day using dry flake food (TetraMin Tropical Flake Fish[®]) supplemented with brine shrimp (*Artemia*) once a day. For breeding, females and males (1:2) were placed in breeding tanks overnight, separated by a transparent barrier, which was removed at the beginning of the next morning light cycle to allow reproduction. The fertilized eggs were collected after one hour and rinsed three times with system water. Next, healthy embryos up to four hours post-fertilization (hpf) were selected using a stereomicroscope and transferred to 24-well plates previously sterilized ($n=30/\text{group}$; 5/well). The embryos were exposed to 25, 100, 250 or 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PPy/*p*-TSA suspended in 1% PF68 plus naïve and vehicle groups, containing 1% PF68 and maintained in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator. All the exposure suspensions and previously sterilized 24-well plates were replaced every 24 h until 144 hpf, when animals were euthanized through cryoanesthesia.

Parameters such as embryos/larvae survival (determined by examining their movement and heart beat), and hatching ($n=30/\text{group}$; seven independent experiments) were analyzed during all the exposure using SMZ1500 stereo microscope (Nikon Instruments Inc.), and were recorded daily.

The zebrafish embryonic spontaneous movement at 24 hpf and heart rate at 48 hpf of randomly selected embryos ($n=10/\text{group}$; eight independent experiments) were analyzed using NIS-Elements D software for Windows 3.2 (Nikon Instruments Inc.). Spontaneous movement was scored when the embryo presented movement events without any touching stimulus for period of one minute and heart beats were also quantified for a minute. Both protocols were performed at room temperature with 10 minutes of acclimatization prior to analysis.

The morphological changes were evaluated at 120 hpf in randomly selected larvae ($n=100/\text{group}$). Body length (μm), ocular distance (μm), and ocular surface area (μm^2) were evaluated using NIS-Elements D software for Windows 3.2, according to the previous reports.

Microscopy

Embryos at 24 and 48 hpf ($n=15/\text{group}$, each time point) were randomly selected and used for both microscopies. For optical microscopy (OM), embryos were visualized using SMZ1500 stereo microscope (Nikon Instruments Inc.) and photographed using NIS-Elements D software for Windows 3.2. For FESEM, embryos were then fixed in 25% glutaraldehyde in phosphate-buffered (0,2 M) for a week and subsequently washed with phosphate-buffered (0,2 M) three times. Post-fixing was performed with 2% osmium tetroxide and phosphate-buffered (0,2 M) followed by three phosphate-buffered (0,1 M) washes. The eggs were dehydrated in an acetone series up to 100%, critical point dried and sputter-coated with gold. Embryos were visualized and photographed using Inspect F50 microscopy (FEI Company).

ATR-FTIR analysis

At 24 and 48 hpf, embryos were randomly selected ($n=10/\text{group}$, each time point) and then washed two times with water from zebrafish re-circulating system. The embryos were euthanized through cryoanesthesia and immediately used in attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR). FTIR spectroscopic investigation was performed using the spectrometer Spectrum 100, PerkinElmer, DTGS detector (resolution 4 cm^{-1} , spectral range $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$, gain 1, 4 scans). Spectra were

obtained using the accessory ATR and applying a force of 40 N. The Spectrum 10 and ACD/Labs software were used for data acquisition and processing.

Locomotion analysis

At 144 hpf, each larvae was placed in a 24-well plate containing 3 mL of system water and recorded individually. After one minute of acclimatization, the locomotor activity was recorded for 5 minutes using a digital HD webcam (Logitech), and analyzed using the software EthoVision[®] XT (Noldus Information Technology). The distance travelled, mean velocity, absolute turn angle, mean meander, acceleration, time in center, number of entries in center, latency to enter in center, time in periphery, number of entries in periphery and latency to enter on periphery were analyzed in four independent experiments ($n > 33$ animals/group).

Gene expression analysis by RT-qPCR

At 48 hpf, the animals were euthanized (20 larvae/sample; $n=4$ /group) and immediately placed in TRIzol reagent (Invitrogen) and maintained at -80°C until total RNA isolation was performed. The cDNA species were synthesized using ImPROm-II Reverse Transcriptase (Promega) after DNase I treatment (DNase I Amplification Grade, Sigma-Aldrich) and RNA quantification and purity measurements using Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

The qPCRs reactions were performed using SYBR[®] Green I dye (Invitrogen) in 25 μL , with 12.5 μL of diluted cDNA (1:50 for *ef1 α* , *rpl13 α* and 1:20 for *hif1- α*) containing a final concentration of 0.2 x SYBR[®], 100 mM dNTP, 1 x PCR buffer, 3 mM MgCl_2 , 0,025 U of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each primer (*ef1 α F*: 5'-CTG GAG GCC AGC TCA AAC AT-3'; *ef1 α R*: 5'-ATC AAG

AAG AGT AGT ACC GCT AGC ATT AC-3' [5]; *rpl13α*F: 5'-TCT GGA GGA CTG TAA GAG GTA TGC-3'; *rpl13α*R: 5'-AGA CGC ACA ATC TTG AGA GCA G-3' [5]; *hif1-α*F: 5'-AGC AGC AGT CAG CTC AAC AA-3'; *hif1-α*R: 5'-TCC ACA CTG TGA AGC AAA G-3' [6]. PCR cycling conditions started with polymerase activation step for 5 min at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72 °C for elongation. Finally, a melting curve analysis was included with fluorescence measures from 60 °C to 99 °C. The relative expression levels, using *ef1α* and *rpl13α* as reference genes, were determined with *7500 Fast Real-Time Software v.2.0.5* (Applied Biosystems), by the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method and considering efficiency per sample calculated by *LinRegPCR software v2016.1* (<http://LinRegPCR.nl>).

References

- [1] X. Xia, J. Yin, P. Qiang, X. Zhao, Electrorheological properties of thermo-oxidative polypyrrole nanofibers, *Polymer* 52 (2011) 786–92.
- [2] S. Kim, W.K. Oh, Y.S. Jeong, J.Y. Hong, B.R. Cho, J.S. Hahn, Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells, *Biomaterials* 32 (2011) 2342–50.
- [3] A. Avdesh, M. Chen, M.T. Martin-Iverson, A. Mondal, D. Ong, S. Rainey-Smith, K. Taddei, M. Lardelli, D.M. Groth, G. Verdile, R.N. Martins, Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction, *J. Vis. Exp.* 18 (2012) e4196.
- [4] J. Soares, T. Pereira, K. Costa, T. Maraschin, N. Basso, M.R. Bogo, Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*), *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 157 (2017) 335–46.
- [5] R. Tang, A. Dodd, D. Lai, W.C. McNabb, D.R. Love, Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39 (2007) 384–90.
- [6] A. McElroy, C. Clark, T. Duffy, B. Cheng, J. Gondek, M. Fast, K. Cooper, L. White, Interactions between hypoxia and sewage-derived contaminants on gene expression in fish embryos, *Aquat. Toxicol.* 108 (2012) 60–9.

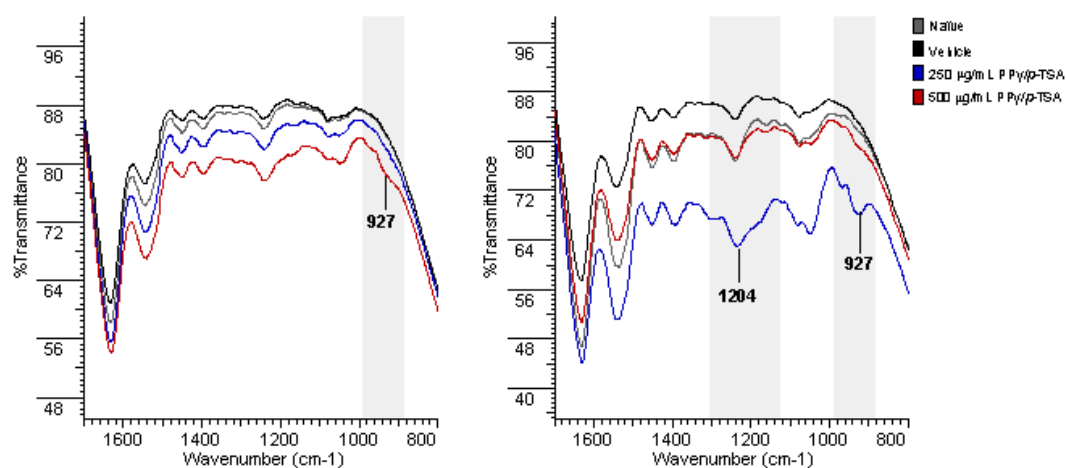


Fig. S1. Evaluation of the PPy/*p*-TSA particulate and embryos chorions interaction. ATR-FTIR spectra of the zebrafish embryos after exposure to the controls (naïve and vehicle) and PPy/*p*-TSA-treated groups (250 and 500 µg/mL) at 24 hpf (A) and 48 hpf (B) in the range 1700–800 cm⁻¹.

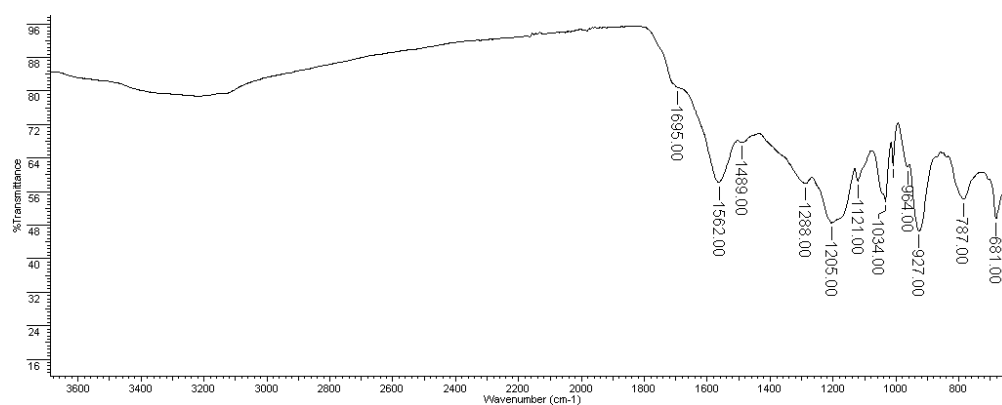


Fig. S2. ATR-FTIR spectrum of PPy/*p*-TSA. The ATR-FTIR spectrum of PPy/*p*-TSA in the 4000–650 cm⁻¹ region.

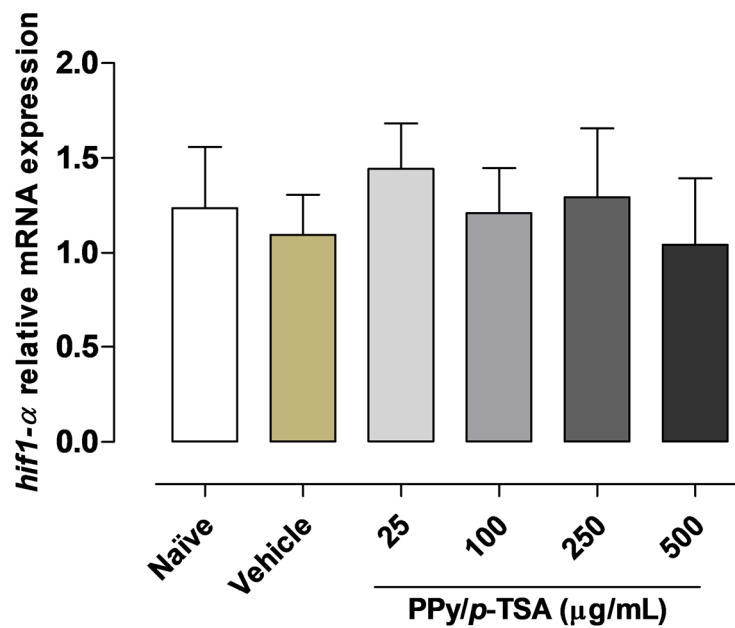


Fig. S3. Effects of PPy/p-TSA exposure in *hif1-α* gene expression. mRNA expression levels of *hif1-α*, using *ef1α* and *rpl13a* as reference genes, in zebrafish larvae at 48 hpf. Error bars represent confidence interval (CI 95%) ($n=4$ /group; pool of 20 larvae, each).

CAPÍTULO III

1. INTRODUÇÃO

2. MATERIAL E MÉTODOS

3. RESULTADOS PARCIAIS

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos tóxicos causados pelas NPs em vários órgãos são avaliados por diferentes mecanismos. Alguns destes mecanismos de avaliação incluem estresse oxidativo e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *Reactive Oxygen Species*) (Nel *et al.*, 2006). A toxicidade geralmente causada pelos nanomateriais é resultado de duas características inerentes aos materiais em escala nano: a ampla área de superfície e sua interação com tecidos/órgãos específicos (Tran *et al.*, 2000; Nel *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é definido como o estado celular na qual se encontra alterado a homeostasia da oxi-redução intracelular, levando a um aumento de ROS e de espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês: *Reactive Nitrogen Species*). Em condições homeostáticas, a célula se encontra em um estado redox balanceado, onde o poder redutor desta célula é capaz de mitigar ou prevenir os danos que seriam causados pela oxidação de espécies (Jones *et al.*, 2006; Marroni *et al.*, 2012). O excesso na geração de ROS pode prevalecer sobre a capacidade antioxidante do sistema inato, acarretando condições celulares pro-oxidantes e, por sua vez, causar peroxidação lipídica, dano ao DNA, expressão gênica irregular ou alteração funcional e degradação proteica (Sant *et al.*, 2017).

A deficiência nos sistemas antioxidantes pode ser de origem enzimática (catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase) e não-enzimática (glutathione, flavonóides, etc) ou por uma combinação de ambos (Jones *et al.*, 2006; Marroni *et al.*, 2012). Recentemente, as definições de estresse oxidativo foram ampliadas para incluir a sinalização e o controle redox (Jones *et al.*, 2006). A sinalização redox, por sua vez, desempenha um papel crucial na fase da embriogênese. Durante este período do desenvolvimento, mudanças no potencial redox celular embrionário podem acarretar o baixo desempenho da proliferação celular, ou ainda prejudicar a diferenciação, apoptose e/ou necrose das células (Hansen & Harris, 2013).

Várias NPs têm demonstrado sua contribuição na indução de ROS e na inibição da ativação de defesas antioxidantes (Donaldson & Stone, 2003; Oberdörster *et al.*, 2004; Nel *et al.*, 2006). Nanomateriais como fulerenos, nanotubos de carbono de parede simples, pontos quânticos e partículas ultrafinas podem produzir ROS (Brown *et al.*, 2001; Shvedova *et al.*, 2003; Yamakoshi *et al.*, 2003; Derfus *et al.*, 2004; Oberdörster,

2004; Sayes *et al.*, 2004). O aumento dos níveis de ROS nos tecidos é atribuído à ativação de vias específicas de sinalização celular relacionadas com o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, dano ao DNA e apoptose (Nel *et al.*, 2006). A principal rota de entrada das NPs nas células inclui a endocitose, que se torna facilitada pela ligação aos receptores de membrana, como receptores de fator de crescimento e integrinas. A extensão da endocitose é dependente do tamanho da NP, visto que pequenas partículas são mais facilmente internalizadas do que partículas de tamanho micro, mesmo que o composto químico e a concentração sejam iguais (Donaldson *et al.*, 2001a; b).

O sistema imune é o responsável por reconhecer, eliminar e proteger o organismo frente a materiais estranhos (O'Shea *et al.*, 2013). Estudos prévios demonstraram que nanomateriais tem o potencial de ativar a resposta imune pró-inflamatória *in vitro* e *in vivo* (Farrera & Fadeel, 2015; Boraschi *et al.*, 2017). Yang e colaboradores (2018) verificaram que embriões de *zebrafish* apresentaram aumento dos níveis de citocinas inflamatórias após serem expostos ao óxido de grafeno (Yang *et al.*, 2018). Corroborando com estes achados, outros estudos utilizando materiais à base de carbono também induziram resposta inflamatória em larvas e adultos de *zebrafish* (Chen *et al.*, 2015a; Cho *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2018). As NPs geralmente são captadas por macrófagos em órgãos onde este tipo celular é abundante. Uma vez que estas NPs são captadas e internalizadas, através de macropinocitose ou endocitose, há a indução da liberação de citocinas através dos macrófagos e inicia-se o perfil inflamatório (Moon *et al.*, 2010).

Além de causar inflamação e estresse oxidativo, nanomateriais podem induzir a modificações epigenéticas, uma vez que há fortes evidências ligando estes achados a genotoxicidade em vertebrados (Liu *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram alterações na metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas, remodelação da cromatina e metilação do RNA após exposição à nanopartículas de materiais à base de carbono (Shyamasundar *et al.*, 2015; Smolkova *et al.*, 2015; Sierra *et al.*, 2016). Além da geração de ROS e da disfunção mitocondrial, estudos prévios também destacaram a toxicidade de materiais a base de carbono utilizando análise de sequência proteômica e transcriptômica de alto rendimento (Semberova *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Seabra *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015a).

A partir dos resultados reportados no Capítulo 2, apresentando taxa de eclosão precoce e a alta afinidade do PPy/*p*-TSA sobre o tecido biológico, o objetivo deste trabalho foi avaliar marcadores de estresse oxidativo, inflamação e morte celular em larvas de *zebrafish* expostas ao PPy/*p*-TSA por três dias, com a finalidade de entender os potenciais mecanismos subjacentes. Para este propósito, foi sintetizado e caracterizado um novo lote do particulado de PPy/*p*-TSA, bem como avaliado sua dispersão em meio aquoso. Além disso, foram avaliados parâmetros *in vivo* como mortalidade, eclosão, marcação de morte celular, migração neutrofílica, marcadores bioquímicos e de expressão gênica para estresse oxidativo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Síntese do PPy/*p*-TSA

O monômero Py (98%, Sigma-Aldrich[®]) foi primeiramente destilado até a obtenção de um líquido incolor, que caracteriza a remoção de impurezas (Patil & Pandey, 2012). A síntese do PPy foi realizada via polimerização química oxidativa em meio aquoso, de acordo com o protocolo adaptado de Xia e colaboradores (2011) (Goel *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). Uma solução A contendo $7,2 \times 10^{-3}$ mol do Py e $3,2 \times 10^{-2}$ mol do dopante ácido *p*-toluenosulfônico monohidratado (APTS, 98,50%, Sigma-Aldrich[®]) em 20 mL de água deionizada permaneceu sob agitação magnética em temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, a solução A recebeu gota a gota uma solução B de 5 mL de água deionizada contendo $12,3 \times 10^{-3}$ mol do agente oxidante cloreto férrico (FeCl₃) 98%, Sigma-Aldrich[®]) (Figura 6). Após 24 h de reação, o produto foi filtrado e lavado com água destilada e etanol para a remoção de resíduos da síntese. O particulado de PPy/*p*-TSA foi seco em estufa (80°C) por 8 h e armazenado em dessecador com sílica.

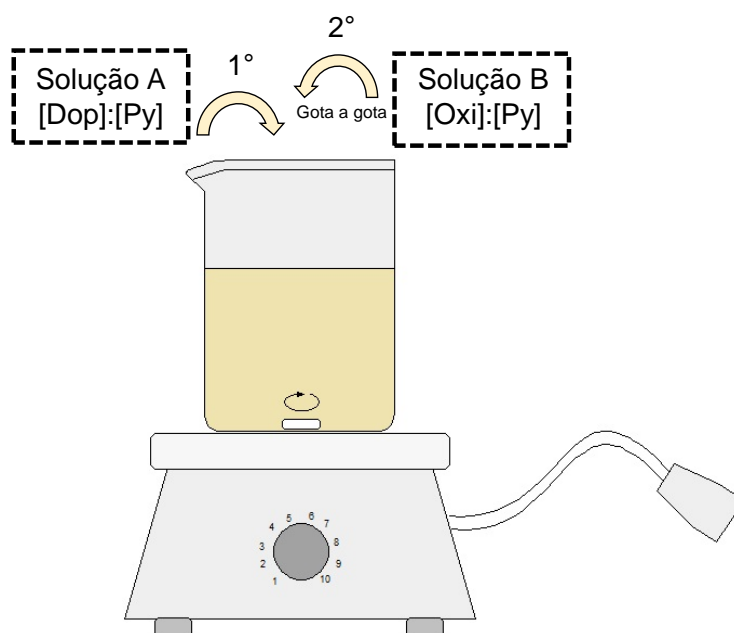


Figura 6. Síntese do PPy/*p*-TSA. Diagrama esquemático da síntese do PPy/*p*-TSA.

2.2. Caracterização do PPy/*p*-TSA

A avaliação das propriedades físico-químicas do PPy/*p*-TSA formado após a síntese são de extrema importância para compreender as características do produto obtido e assim, auxiliarem no entendimento da interação do polímero com o meio biológico.

As caracterizações das amostras produzidas foram realizadas rigorosamente sempre após as sínteses, ou seja, antes de serem inseridas no protocolo de exposição *in vivo*, como forma de garantir o controle de qualidade da síntese. A seguir são descritas as técnicas de caracterizações realizadas após a síntese do polímero.

2.2.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A estrutura química do PPy/*p*-TSA foi determinada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro da Perkin-Elmer (modelo Spectrum One FT-IR Spectrometer) na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras. Foram confeccionadas pastilhas em forma de disco (1 x 10 mm) do PPy/*p*-TSA com KBr (brometo de potássio) sob pressão de 10 toneladas, em uma prensa Perkin-Elmer Instruments. As pastilhas foram secas em estufa (100°C) por 12 h antes da análise.

2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo

A morfologia do polímero e a avaliação do seu tamanho foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM, do inglês: *Field-Emission Scanning Electron Microscopy*) através de microscópio modelo Inspect F50 (FEI Company) equipado com espectrômetro de raios X de energia dispersiva para análise elementar (EDS, do inglês: *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) com detector de desvio de silício (SDD, Apollo SDD, EDAX® products). As amostras foram fixadas com auxílio de uma fita dupla face de carbono sobre um suporte (*stub*), e posteriormente, recobertas com uma fina camada de ouro por um metalizador (BALTEC SCD 005). As imagens foram registradas no modo de retroespalhamento elétrico usando uma tensão de aceleração de 20 kV em variados aumentos de magnitude. O diâmetro médio da forma do particulado de PPy/*p*-TSA foi medido no programa ImageJ, com uma contagem de no mínimo 100 partículas por imagem, totalizando n=3.000 contagens. A análise química (microanálise elementar) da superfície do polímero foi realizada por EDS após a captura das imagens por FESEM.

2.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia do polímero do PPy/*p*-TSA também foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, do inglês: *Transmission Electron Microscopy*) através de microscópio modelo Tecnai G2 T20 (FEI Company) equipado com EDS e com detector de desvio de silício (SDD, Apollo SDD, EDAX® products). As amostras foram dispersas em acetona por 1 h em banho ultrassônico (frequência de 40 KHz, modelo Q5.9L, Ultronique) e em seguida uma pequena alíquota foi gotejada no suporte de amostra (*grid* de cobre). Após a evaporação do solvente, o material foi armazenado em estufa a vácuo por 12 h antes da análise. As imagens foram capturadas com aceleração de elétrons de 200 kV em variados aumentos de magnitude. A análise química (microanálise elementar) da superfície do polímero foi realizada por EDS após a captura das imagens por TEM.

2.2.4. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica do PPy/*p*-TSA foi determinada pelo método da sonda de quatro pontas (Giroto & Santos, 2002; Araújo *et al.*, 2003). As amostras foram analisadas em pastilhas na forma de disco (13,4 mm de diâmetro, <1 mm de espessura)

preparadas por compactação do pó de PPy/*p*-TSA com auxílio de um pastilhador sob pressão de 10 toneladas, em uma prensa (Perkin-Elmer Instruments). Uma fonte de tensão modelo 236 (Keithley Instruments) e um Multímetro (modelo HP34401) foram usados para medição elétrica na configuração de quatro sondas.

2.3. Preparo das suspensões de PPy/*p*-TSA

O preparo das suspensões de PPy/*p*-TSA foram realizadas de acordo com o protocolo de literatura prévia (Costa *et al.*, 2019). As diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA foram pesadas separadamente e dispersas em solução (1%) de PF-68 com água do meio de manutenção dos animais. Esta água é proveniente de sistema de osmose reversa recondicionada com sais (Instant Ocean[®]) e cuja temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), pH (6,5-7,5), condutividade (300-1500 μS) e oxigenação são controlados automaticamente (Zebtec Tecniplast[®]). Foram utilizadas suspensões de 25, 100, 250, e 500 $\mu\text{g/mL}$ de PPy/*p*-TSA com base em dados prévios (Kim *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2019), as quais foram dispersas em banho ultrassônico durante 1 h (frequência de 40 KHz, modelo Q5.9L, Ultronique) com posterior agitação magnética por 24 h. O PF-68 é o dispersante escolhido para esta pesquisa, pois estudos prévios já mostraram sua biocompatibilidade com o modelo animal (Pan *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2019). O pH e a condutividade das suspensões foram aferidos logo após o período de agitação magnética, corrigindo-os se necessário. As suspensões foram acondicionadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, para evitar degradação do material e garantir sua estabilidade até o momento da utilização nas análises posteriores (Ferraz *et al.*, 2012).

2.4. Caracterização das suspensões de PPy/*p*-TSA

As caracterizações das suspensões preparadas foram realizadas rigorosamente após o período de agitação magnética, ou seja, antes de serem inseridas no protocolo de tratamento *in vivo*, como forma de garantir a correta análise no tempo inicial ($t = 0$ h). A seguir serão descritas as técnicas de caracterizações realizadas para as suspensões preparadas.

2.4.1. Espalhamento Dinâmico de Luz

A medida do diâmetro hidrodinâmico do PPy/*p*-TSA em suspensão foi realizada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês: *Dynamic Light Scattering*) em diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA (25, 100, 250 e 500 µg/mL) em solução aquosa a 1% de PF-68. O DLS foi realizado em um Zetasizer (modelo ZEN3600, Malvern Instruments Ltd). A medição do tamanho foi determinada pela média de três leituras independentes, cada uma obtida a partir da média de 15 contagens realizadas pelo equipamento durante a análise do DLS a 25°C, e pH na faixa de 6,8-8,5. As suspensões foram analisadas no tempo zero (t = 0 h) e tempo 24 h (t = 24 h) pós-preparação.

2.4.2. Espectroscopia UV-visível

Para avaliar a estabilidade das suspensões de PPy/*p*-TSA, a absorbância em 260 nm foi acompanhada em cada concentração ao longo de 24 h, através do sistema de Espectroscopia UV-visível (UV-Vis) Agilent 8453, Hewlett Packard). As suspensões das quatro concentrações (25, 100, 250 e 500 µg/mL) foram analisadas do t = 0 h até t = 24 h, de 6 em 6 h.

2.5. Delineamento experimental *in vivo*

A pesquisa foi realizada na forma de ensaio controlado randomizado, onde os animais a serem pesquisados foram alocados aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais, para posteriormente serem analisados e comparados.

2.5.1. Animais

Para a obtenção dos embriões foram utilizados animais da espécie *Danio rerio*, linhagem AB, provenientes de matrizes de reprodução com idade igual ou superior a seis meses. Estas matrizes foram mantidas em aquários com sistema de filtração em série (Zebtec, Tecniplast[®]), onde as condições necessárias para a reprodução dos animais como pH (6,5-7,5), temperatura (26 ± 2°C) e luz (ciclo de claro-escuro de 14:10 h) (Westerfield, 2007) são rigorosamente controladas. Os embriões foram obtidos a partir do cruzamento destas matrizes na proporção de dois machos para uma fêmea, separados por barreira transparente, em beteiras de reprodução, ao final do dia. O acasalamento foi realizado no início da manhã seguinte, a partir da retirada da barreira.

Os ovos provenientes do acasalamento foram coletados cerca de uma hora após a fecundação e acondicionados em placas de Petri, onde passaram por higienização e seleção dos embriões viáveis.

O número de animais utilizados neste estudo foram o mínimo necessário para demonstrar resultados consistentes. Esta pesquisa foi desenvolvida de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo os protocolos experimentais e o número de animais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 15/00479).

2.5.2. Exposição dos animais ao PPy/*p*-TSA

Para a exposição dos grupos com diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA e os grupos controle (Naïve e Veículo), foram utilizados embriões de até quatro horas pós-fertilização (hpf) para o início dos experimentos, sendo expostos até 72 hpf ou o equivalente a 3 dias.

Nos grupos expostos, as suspensões contendo o particulado de PPy/*p*-TSA nas diferentes concentrações (25, 100, 250 e 500 µg/mL) com PF-68 (1%), foram colocadas em contato com os embriões de *zebrafish* após passarem pelo protocolo de dispersão em banho ultrassônico (1 h) e posterior agitação magnética (24 h). Para o preparo dos grupos Naïve e Veículo foram utilizados água do sistema sem e com 1% de PF-68, respectivamente. Para o grupo Veículo foi adotado o mesmo protocolo de preparação das suspensões que continham PPy/*p*-TSA.

As suspensões foram preparadas diariamente, bem como substituídas uma vez ao dia sempre no mesmo horário durante o período de exposição, a fim de garantir a estabilidade das dispersões das NPs do polímero. O mesmo cuidado tomado com a periodicidade das trocas das suspensões contendo as NPs foi adotado aos grupos controles. Durante o período de exposição, os animais foram alocados em placas de Petri, sendo destinados até 50 animais por placa, e estas placas foram mantidas em estufa incubadora BOD (Demanda Química do Oxigênio).

Durante todo o período de exposição foi averiguado a análise de sobrevivência e a taxa de eclosão dos animais. De acordo com o protocolo de exposição, ao final de 72 hpf foram realizadas as seguintes avaliações: morte celular, mieloperoxidase neutrofílica (MPO), estresse oxidativo, TEM e análise da expressão gênica por RT-

qPCR (do inglês: *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) de marcadores de estresse oxidativo (Figura 7).

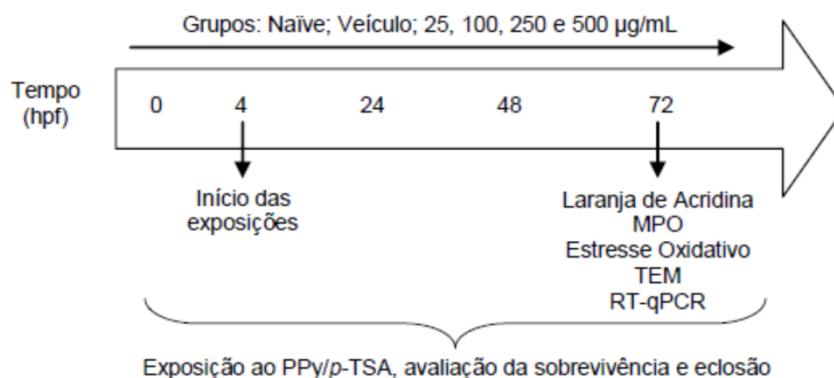


Figura 7. Protocolo de exposição. Diagrama esquemático do protocolo de exposição *in vivo*.

2.5.3. Análise de sobrevivência e taxa de eclosão

A análise de sobrevivência e a taxa de eclosão foram realizadas ao longo de todo o período de exposição dos animais. Durante as exposições, os animais foram monitorados nos tempos 24, 48 e 72 hpf através de microscópio invertido (Nikon® SMZ), onde as análises resultaram em uma curva de sobrevivência e taxa de eclosão (Parng *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2013).

2.5.4. Morte celular

A determinação da morte celular foi realizada nos animais no último dia de exposição. As larvas de *zebrafish* foram expostas aos seus devidos tratamentos (tratados e controles), e ao fim do período de exposição foram lavadas com água do sistema para a retirada do nanomaterial em excesso. A solução de laranja de acridina foi aplicada no meio na concentração final de 2 µg/mL. Após 30 minutos o meio foi retirado e os poços contendo as larvas tiveram sua água trocada três vezes para a retirada do marcador de laranja de acridina. Os animais foram anestesiados com tricafina em uma concentração de 0,04 mg/mL e para a avaliação da marcação de apoptose tecidual foi utilizado microscópio de fluorescência Olympus IX71 (OLYMPUS®) (Tucker & Lardelli, 2007).

2.5.5. Avaliação da mieloperoxidase neutrofílica

A migração neutrofílica foi avaliada através da média da atividade da MPO, de acordo com literatura prévia, como marcador de resposta inflamatória (Leite *et al.*, 2013). A MPO foi avaliada em todos os grupos (tratados e controles) no último dia de exposição, após a eutanásia. As amostras foram homogeneizadas em 500 µL de tampão de EDTA/NaCl (pH 4.7) e centrifugadas a 5.000 rpm, por 20 min a 4°C. O *pellet* foi suspenso em 200 µL de tampão de brometo de hexadeciltrimetilamio (pH 5.4) e as amostras foram congeladas. Após o descongelamento, as amostras foram re-centrifugadas e o sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO. Os resultados foram expressos como densidade óptica por miligrama de tecido.

2.5.6. Estresse oxidativo

Com a finalidade de avaliar se as NPs de PPy/*p*-TSA tem a capacidade de induzir estresse oxidativo nos animais, foi realizada a avaliação da atividade da catalase (CAT) e a determinação do conteúdo de glutathiona redutase (GSH) nos animais no último dia de exposição, após a eutanásia. A atividade da CAT foi avaliada por meio da diminuição de concentração de peróxido de hidrogênio (Aebi, 1984; Leite *et al.*, 2013). O conteúdo da GSH foi determinado utilizando 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico/DTNB) (Shim *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2013).

2.5.7. Expressão gênica por RT-qPCR

A análise molecular da expressão gênica foi realizada através da técnica de RT-qPCR, seguindo as diretrizes "Informações Mínimas para a Publicação de Experimentos de PCR Quantitativos em Tempo Real" (MIQE Guidelines) (Bustin *et al.*, 2009; 2013), através de metodologia previamente descrita (Costa *et al.*, 2019).

O RNA total foi extraído utilizando-se TRIzol[®] Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA extraído (relação de absorvância 260/280 nm deve ser entre 1.8 e 2.0) e a concentração, foi determinada através do espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e após tratado com Deoxyribonuclease I – Amplification Grade (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, Missouri, USA) para eliminar contaminação com DNA genômico. O cDNA foi sintetizado com o kit ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a

partir de 1 µg de RNA total seguindo instruções do fornecedor. PCR quantitativo foi realizado utilizando SYBR® Green I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para detectar a síntese da fita dupla.

Os níveis de expressão relativa foram determinados com o 7500 Real-Time PCR System Software v.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). A eficiência por amostra foi calculada utilizando o software LinRegPCR 2018.0 Software (<http://LinRegPCR.nl>) e os níveis de expressão relativa foram determinados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Bustin *et al.*, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers utilizados para avaliar a expressão gênica (RT-qPCR).

Gene	Rota metabólica	Primer Forward (5'-3') Primer Reverse (3'-5')	Referência bibliográfica
<i>Rpl13a</i>	-----	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	Tang <i>et al.</i> , 2007
<i>EF1a</i>	-----	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	Tang <i>et al.</i> , 2007
<i>gst</i>	Conjugação com GSH e xenobióticos	CAGTTGCCTAAATTTGAAGATGG AGCTTCCAGAAGATGAACATCAG	Rola <i>et al.</i> , 2014
<i>gpx</i>	Degradação de H ₂ O ₂	AAGAAATCCTGCAGTCTCTGAA GAACCTTCTGCTGTACCTCTTGA	Rola <i>et al.</i> , 2014
<i>sod1</i>	Degradação de O ₂ ⁻	TCTCCCTGACCTCACATATGACT TGGCAGCTGATATCTTCTCTTTC	Rola <i>et al.</i> , 2014
<i>sod2</i>	Degradação de O ₂ ⁻	CACCGTCTATTTCAATCAAGAGG AGAATGTTGGCCTGACAAAGTTA	Rola <i>et al.</i> , 2014
<i>cat</i>	Degradação de H ₂ O ₂	AACAACACCCCATCTTCTTTAT ATGTGTGTCTGGGTAGGAGAAAA	Rola <i>et al.</i> , 2014

2.6. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi adotado para todas as análises. A análise estatística dos resultados paramétricos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Para análise da curva de sobrevivência foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

Softwares 7500 Real-Time PCR System Software v.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) e GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, USA), foram utilizados para auxiliar nas análises estatística.

3. RESULTADOS PARCIAIS

3.1. Caracterização das partículas e estabilidade das suspensões de PPy/*p*-TSA

A morfologia das partículas de PPy dopadas com *p*-TSA foi caracterizada através de FESEM e TEM (Figuras 8A, B). Através das imagens podemos verificar que o particulado apresentou morfologia granular com partículas esféricas irregulares. A distribuição estatística do diâmetro das partículas de PPy/*p*-TSA foram mensuradas através das imagens por FESEM (Figura 8A), onde mostram que cerca de 92% das partículas apresentaram tamanhos na faixa de 110- 477 nm (Figura 8C). O tamanho médio das partículas foi de 265 ± 120 nm (média \pm desvio padrão), onde foi encontrado tamanho mínimo de 63 nm e tamanho máximo de 984 nm. Na imagem por TEM (Figura 8B) é possível observar que ocorreu uma agregação com diferentes tamanhos e formas das pequenas partículas do PPy/*p*-TSA sintetizado.

O valor da condutividade elétrica do PPy/*p*-TSA foi de $2,0 \times 10^{-6}$ S/cm e caracteriza-se como material semicondutor (10^{-7} – 10^3 S/cm) (Ateh *et al.*, 2006a; Balint *et al.*, 2014). Através do espectro de FTIR, o PPy/*p*-TSA (Figura 8A) mostrou características estruturais consistentes com estudos prévios (Costa *et al.*, 2019). Os picos característicos em 1554 e 1479 cm^{-1} correspondem a vibração de alongamento de C=C e C-N do PPy, respectivamente (vibração fundamental do anel de Py). O pico em 3131 cm^{-1} foi atribuído à vibração de alongamento de N-H e o pico de 1291 cm^{-1} a deformação no plano de C-H ou C-N (Ateh *et al.*, 2006a; Reung-U-Rai *et al.*, 2008; Goel *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). Os picos correspondentes a 1038 e 1211 cm^{-1} podem ser atribuídos as vibrações de alongamento simétrico e assimétrico de O=S=O, respectivamente, e o pico em 930 cm^{-1} foi atribuído a vibração do grupo $-\text{SO}^{-3}$, demonstrando que o PPy/*p*-TSA sintetizado encontra-se em estado de dopagem (Ateh *et al.*, 2006a; Reung-U-Rai *et al.*, 2008; Goel *et al.*, 2010; Runge *et al.*, 2010). O PPy/*p*-TSA no seu estado de dopagem também foi confirmado através da análise por EDS, que indica a presença de enxofre (S) dos grupos de $-\text{SO}^{-3}$ que são procedentes do agente dopante (Figura 8B).

As diferentes concentrações das suspensões contendo PPy/*p*-TSA foram monitoradas através de UV-Vis durante o período de 24 h (Figura 8D, E). Os dados em relação à estabilidade das dispersões de PPy/*p*-TSA mostram, respectivamente, uma redução de 9%, 6%, 36% e 11% das partículas em suspensão nas dispersões de 25, 100,

250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ durante as primeiras doze horas de exposição. Em dezoito horas de exposição, a redução das dispersões foi de 27%, 38%, 52% e 34%, respectivamente da menor para a maior concentração. Nas últimas seis horas, todas as suspensões mostraram pouca precipitação das partículas, indicando que ocorreu uma estabilidade das suspensões após as primeiras dezoito horas da preparação. A suspensão correspondente a 25 $\mu\text{g/mL}$ mostrou a melhor estabilidade, preservando 74% de sua concentração após vinte e quatro horas de preparação, seguido pelas suspensões de 500, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$, com a estabilidade preservada em torno de 61%, 57% e 45%, respectivamente (Figura 8E).

O tamanho da distribuição das partículas de PPy/*p*-TSA no $t = 0$ h e no $t = 24$ h também foram acompanhadas através da técnica de DLS e estão ilustrados na Figura 8F e G. Foi observado que no $t = 0$ h a suspensão de maior concentração (500 $\mu\text{g/mL}$) apresentou maior faixa para o tamanho das partículas em suspensão (125 a 6000 nm). Após vinte e quatro horas, todas as suspensões apresentaram tamanhos abaixo de 1800 nm (Figura 8F).

As suspensões do particulado após a preparação ($t = 0$ h) apresentaram tamanho médio das partículas de 2150 ± 599 , 1922 ± 137 , 2028 ± 176 e 1660 ± 24 nm (média \pm desvio padrão) para as suspensões de 25, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, analisadas por DSL (Figura 8G). O tamanho das partículas que permaneceram em suspensão em vinte e quatro horas ($t = 24$ h) foi de 1023 ± 75 , 1324 ± 46 , 1070 ± 34 e 860 ± 18 avaliadas por DSL (Figura 8G). Os resultados demonstram que a maior porcentagem das partículas de PPy/*p*-TSA na água do sistema com 1% de PF-68 decantaram principalmente nas dezoito horas iniciais e as menores partículas permaneceram suspensas com similar tamanho para todas as suspensões nas seis horas finais.

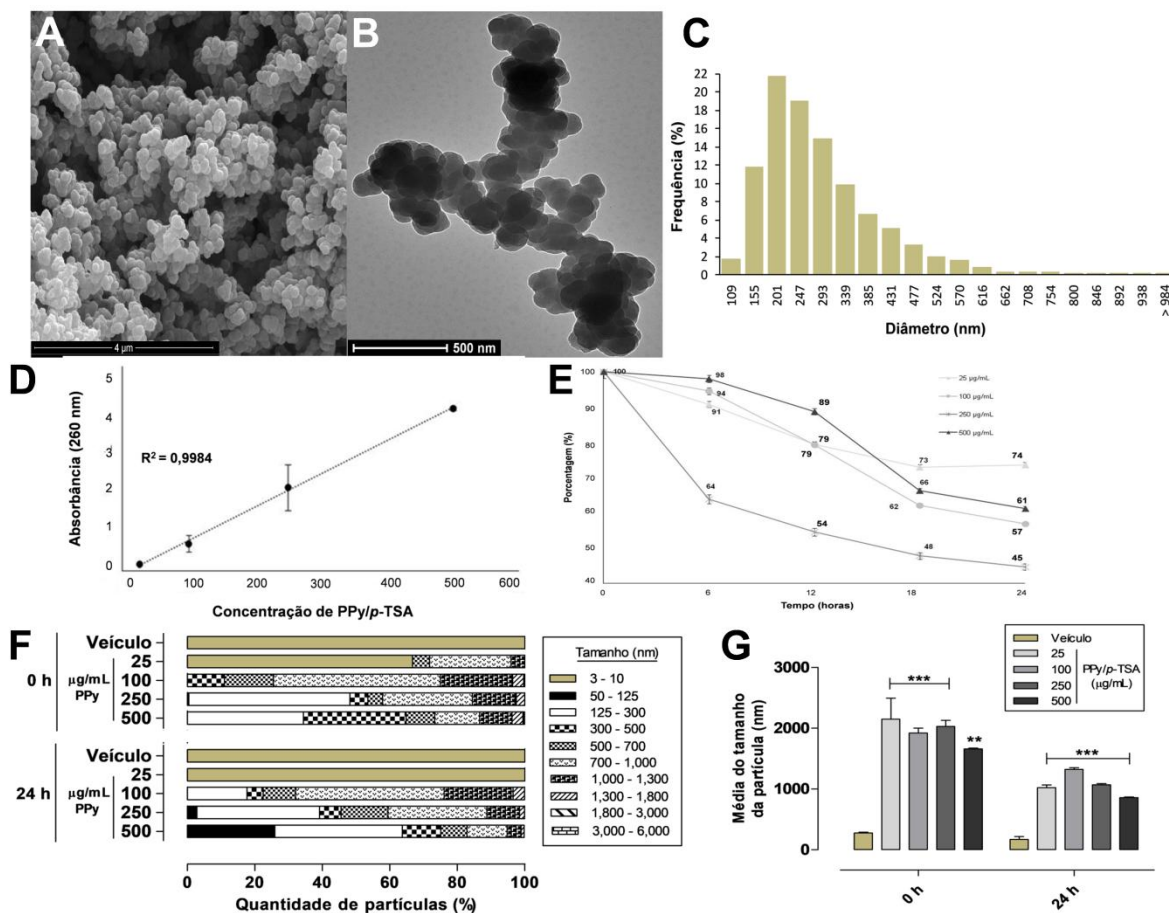


Figura 8. Caracterização do polímero seco, estabilidade e caracterização das suspensões de PPy/p-TSA. Imagens das partículas de PPy/p-TSA por FESEM (A) e dos aglomerados por TEM (B); histograma da distribuição estatística das partículas do PPy/p-TSA obtidas através de imagens por FESEM (C); curva de calibração (D) e evolução da estabilidade (E) das suspensões de PPy/p-TSA através de espectrometria por UV-Vis (média ± desvio padrão; n=3/grupo). Distribuição do tamanho das partículas através de DLS (F) e média do tamanho das partículas de PPy/p-TSA em suspensão (Z-média) (G) no t = 0 h e t = 24 h (média ± desvio padrão; n=3/grupo). ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ são significativamente diferentes do grupo Veículo (One-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Escala: 4 μm e 500 nm. FESEM: *Field-Emission Scanning Electron Microscopy*; TEM: *Transmission Electron Microscopy*; DLS: *Dynamic Light Scattering*.

3.2. Efeitos da exposição do PPy/p-TSA sobre o desenvolvimento embrionário

Com a finalidade de avaliar os possíveis efeitos toxicológicos do polímero *in vivo*, parâmetros como mortalidade e taxa de eclosão foram avaliados nos embriões e larvas de *zebrafish* expostos a diferentes concentrações de PPy/p-TSA. Como mostrado na Figura 9A, não houve alteração significativa na taxa de mortalidade em nenhum grupo exposto as suspensões contendo PPy/p-TSA quando comparado aos grupos Naïve e Veículo. O tempo de eclosão considerado normal para os embriões de *zebrafish* compreende a faixa de 48-72 hpf (Kimmel *et al.*, 1995). No entanto, os grupos expostos

ao PPy/*p*-TSA apresentaram significativo aumento na taxa de eclosão, quando comparado aos grupos Naïve e Veículo, principalmente em 48 hpf. Interessantemente, o grupo exposto a 250 µg/mL de PPy/*p*-TSA apresentou eclosão precoce, onde os primeiros eventos de eclosão foram verificados em 24 hpf (Figura 9B).

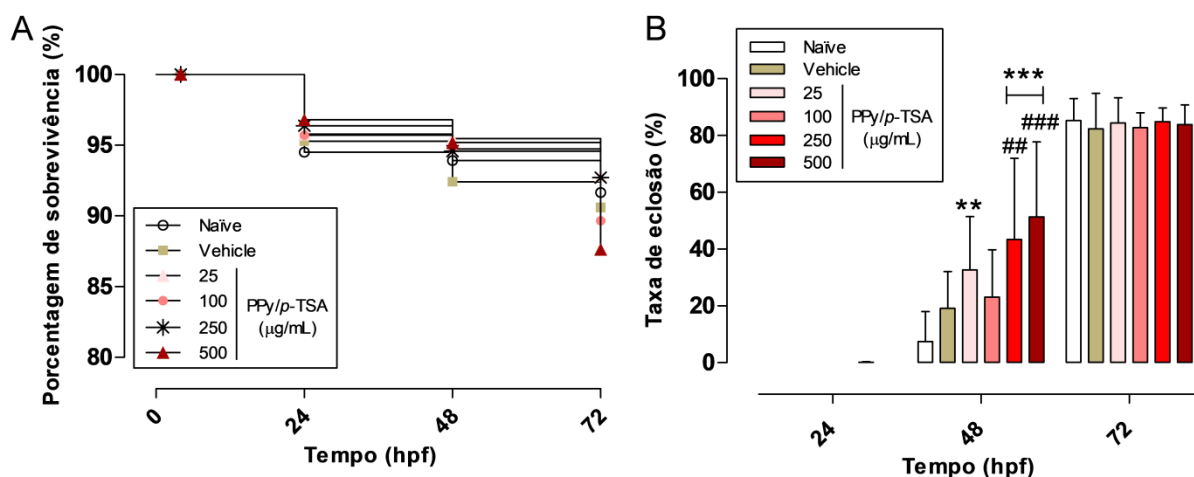


Figura 9. Curva de sobrevivência e taxa de eclosão dos animais expostos ao PPy/*p*-TSA. A sobrevivência (A) e a taxa de eclosão (B) foram avaliadas durante três dias de exposição (de 4 a 72 hpf, n=3.787/grupo). A sobrevivência foi estimada através do método de Kaplan-Meier. As barras de erros nos gráficos de colunas representam o desvio padrão. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ são significativamente diferentes do grupo Naïve; ## $P < 0.01$ e ### $P < 0.001$ são significativamente diferentes do grupo Veículo (Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

3.3. Marcação celular por laranja de acridina

O laranja de acridina é um corante metacromático útil para a determinação do ciclo celular. Com base nisso, esta técnica foi utilizada com o objetivo de verificar se a exposição a diferentes concentrações do PPy/*p*-TSA é capaz de induzir a morte celular nos neuromastos das larvas de *zebrafish*.

Através do uso da coloração de laranja de acridina foi possível visualizar que os animais expostos ao PPy/*p*-TSA apresentaram marcações sugestivas de morte celular ao longo da linha lateral do corpo do animal, principalmente na porção caudal envolvendo os neuromastos (Figura 10) (Deng *et al.*, 2018). Neuromastos são células que tem a função de detectar vibrações, variações de temperatura, ondas de choque e alguns parâmetros químicos na água, orientando a natação e a detecção de presas ou predadores (Nicolson, 2017). As imagens abaixo apresentam a marcação celular aparente nos animais tratados em relação aos grupos Naïve e Veículo.

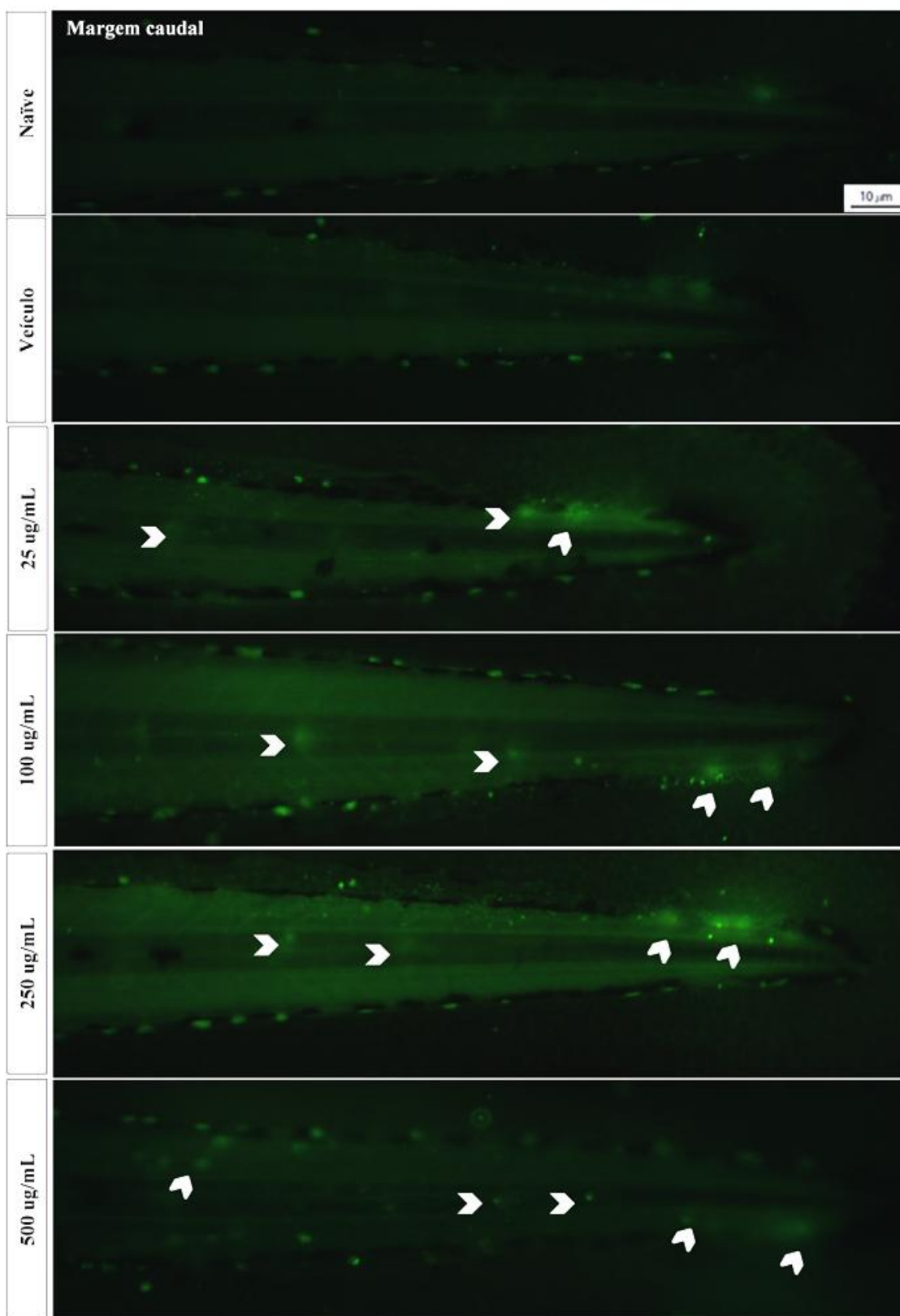


Figura 10. Marcação celular em larvas de *zebrafish* expostas ao PPy/*p*-TSA. Imagens qualitativas de larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de suspensões contendo PPy/*p*-TSA apresentando marcação sugestiva de morte celular através do laranja de acridina. As imagens foram capturadas através de objetiva de 10x. Escala: 10 µm.

3.4. Atividade da mieloperoxidase neutrofílica

Neutrófilos são as células leucocitárias mais abundantes na circulação sanguínea de humanos e também no *zebrafish*. Estas células são as primeiras a serem recrutadas pelo sistema imune inato frente a uma infecção ou lesão tecidual (Harvie & Huttenlocher, 2015). A migração neutrofílica das larvas de *zebrafish* foi avaliada pela média da atividade da MPO, a fim de verificar se o particulado de PPy/*p*-TSA foi capaz de causar uma resposta inflamatória nos animais expostos. O grupo exposto a 500 µg/mL de PPy/*p*-TSA apresentou significativa diminuição dos níveis da MPO quando comparado aos grupos Naïve e Veículo (Figura 11).

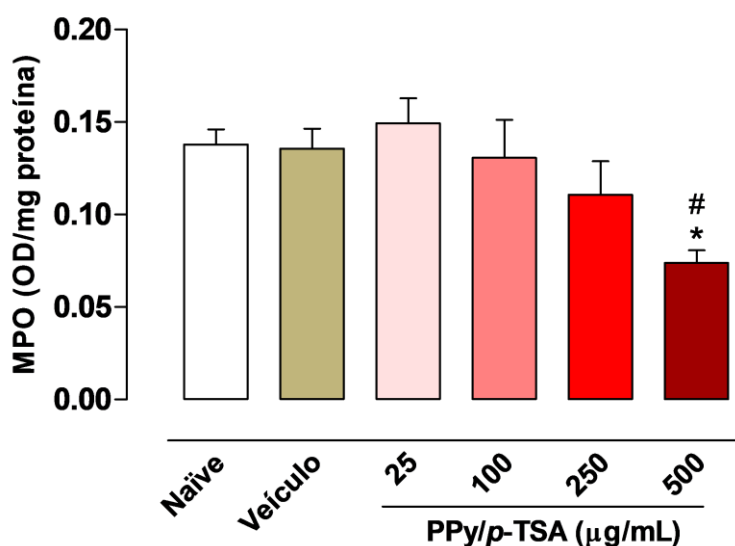


Figura 11. Atividade da mieloperoxidase em larvas de *zebrafish* expostas ao PPy/*p*-TSA. Os níveis da mieloperoxidase foram significativamente diminuídos no grupo exposto a maior concentração de PPy/*p*-TSA. As barras de erros no gráfico representam o desvio padrão, e cada coluna representa a média de n=8/grupo, pool 20 larvas. * $P < 0.05$ é significativamente diferente do grupo Naïve; # $P < 0.05$ é significativamente diferente do grupo Veículo (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

3.5. Análise de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um mecanismo de toxicidade desencadeado por vários tipos de NPs, resultando na geração de ROS em células específicas quando em contato com o nanomaterial (Chen *et al.*, 2016). Com base neste princípio, as larvas de *zebrafish* foram avaliadas quanto a atividade e o conteúdo de alguns marcadores de estresse oxidativo, após serem expostas a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA. De

acordo com a Figura 12A, a atividade da CAT foi significativamente reduzida nos grupos expostos ao PPy/*p*-TSA, se comparada ao grupo Naïve. No entanto, o conteúdo da GSH mostrou-se elevado nos grupos expostos as maiores concentrações (250 e 500 µg/mL) de PPy/*p*-TSA, em relação ao grupo Veículo (Figura 12B).

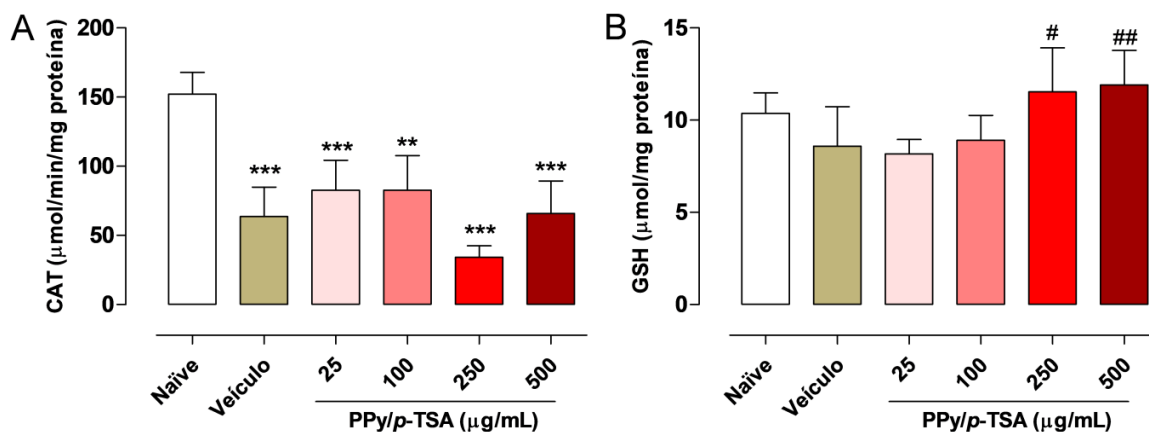


Figura 12. Efeitos da exposição do PPy/*p*-TSA no estresse oxidativo. A atividade da CAT mostrou-se diminuída (A), no entanto, o conteúdo da GSH mostrou-se aumentado (B) quando os animais foram expostos ao PPy/*p*-TSA. As barras de erros no gráfico representam o desvio padrão, e cada coluna representa a média de n=4/pelo menos por grupo para CAT, e n=7/pelo menos por grupo para GSH, ambos com *pool* 20 larvas. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ são significativamente diferentes do grupo Naïve; # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ são significativamente diferentes do grupo Veículo (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey). CAT: Catalase; GSH: Glutathione.

3.6. Análise da expressão gênica para estresse oxidativo

ROS também são importantes na sinalização do dano ao sistema imune, e sua produção regula a ativação de fatores de transcrição e a produção de citocinas (Martinon, 2010). O estresse oxidativo pode induzir dano celular e ao DNA, além de aumentar a liberação de ROS devido à ativação de células fagocíticas e assim, contribuir para o dano tecidual (Olivari *et al.*, 2008).

A análise da expressão gênica de marcadores relacionados ao estresse oxidativo também foram avaliados nas larvas de *zebrafish* ao final do período de exposição ao PPy/*p*-TSA. De acordo com a Figura 13A, o resultado da expressão gênica para *gst* não teve diferença estatística em relação aos grupos controle (Naïve e Veículo). Por outro lado, a expressão gênica para *gpx* foi diminuída no grupo exposto a 100 µg/mL de PPy/*p*-TSA quando comparado ao grupo Naïve, e os grupos expostos as maiores

concentrações do polímero (100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), tiveram diminuição da expressão quando comparado ao grupo Veículo (Figura 13B).

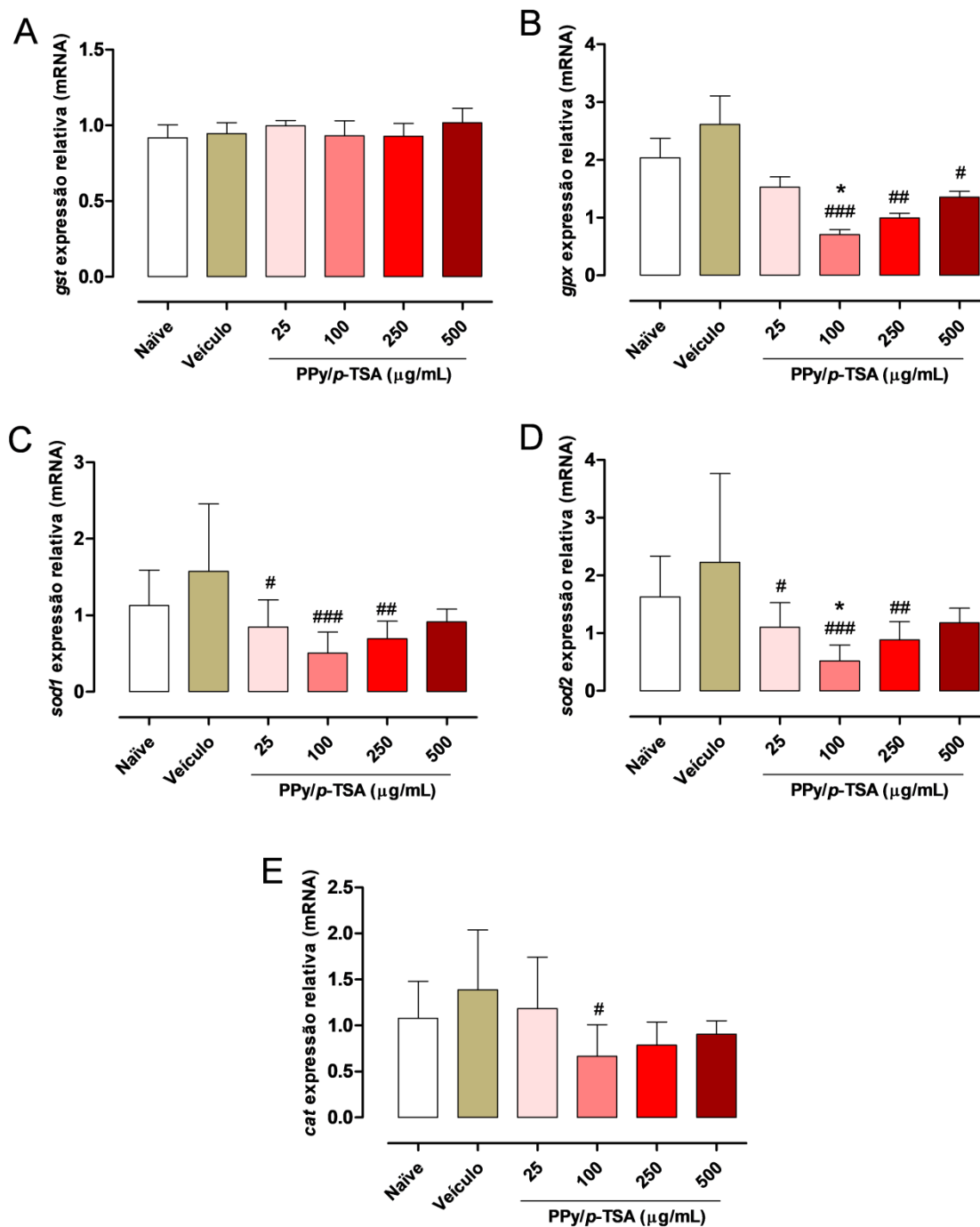


Figura 13. Expressão gênica de marcadores para estresse oxidativo. Efeitos da exposição ao PPy/p-TSA sobre os níveis de mRNA de *gst* (A), *gpx* (B), *sod1* (C), *sod2* (D) e *cat* (E) nas larvas de *zebrafish*. Os embriões de *zebrafish* foram expostos a diferentes concentrações do polímero durante três dias. As barras de erros nos gráficos representam o desvio padrão, e cada coluna representa a média de n=4/grupo, pool de 25 larvas. * $P < 0.05$ é significativamente diferente do grupo Naive; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ e ### $P < 0.001$ são significativamente diferentes do grupo Veículo (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Os grupos expostos às concentrações de 25, 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de PPy/*p*-TSA tiveram diminuição da expressão gênica para *sod1* em relação ao grupo Veículo (Figura 13C). Da mesma forma, estes mesmos grupos apresentaram expressão diminuída para *sod2* em relação ao grupo Veículo, além do grupo de 100 $\mu\text{g/mL}$ de PPy/*p*-TSA apresentar diminuição da expressão em relação ao grupo Naïve (Figura 13D). Na Figura 13E, se observa que houve a diminuição da expressão gênica de *cat* no grupo exposto a 100 $\mu\text{g/mL}$ de PPy/*p*-TSA em comparação ao grupo Veículo.

CAPÍTULO IV

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2. PERSPECTIVAS

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polímero PPy tem atraído a atenção de pesquisadores por se tratar de um polímero com boa condutividade elétrica, propriedades mecânicas versáteis, boa estabilidade química, além de possuir síntese simples e com bom rendimento. Sendo assim, a sua aplicação em diversas áreas da indústria de manufaturados, bem como em pesquisas na área da medicina reparativa têm crescido exponencialmente. No entanto, o entendimento dos riscos e a toxicidade potencial causada pela exposição deste nanomaterial no organismo ainda precisam ser investigados e melhor avaliados.

No presente trabalho, a síntese de NPs de PPy/*p*-TSA foram obtidas a partir do monômero de Py, através de polimerização química oxidativa em meio aquoso e dopadas com APTS. No lote 1 (que compreende os resultados do Capítulo I) foram encontradas 84% de partículas apresentando tamanhos nas faixas de 178 - 518 nm. O tamanho médio encontrado destas partículas foi de 321 ± 139 nm, sendo o tamanho mínimo de 23 nm e o tamanho máximo de 896 nm. A condutividade elétrica estimada do lote 1 foi de $4,4 \times 10^{-6}$ S/cm. Para o lote 2 (segunda síntese que compreende os resultados parciais) foram encontradas 92% das NPS apresentando tamanhos nas faixas de 110 ± 477 nm. O tamanho médio encontrado destas partículas foi de 265 ± 120 nm, sendo o tamanho mínimo de 63 nm e o tamanho máximo de 984 nm. A condutividade elétrica estimada do lote 2 foi de $2,0 \times 10^{-6}$ S/cm. Em ambas sínteses foi, portanto, possível obter partículas de escala nano, mesmo que os tamanhos mínimos e máximos tenham divergido entre os lotes. Embora o protocolo de síntese e o controle de qualidade deste nanomaterial tenham sido os mesmos, as diferenças quanto aos tamanhos das partículas pode ser atribuído há fatores externos, como temperatura e umidade do dia, o que acaba influenciando no desempenho da síntese e, por sua vez, no tamanho das partículas.

A caracterização das dispersões das NPs com 1% PF68 evidenciou que o material do lote 1 alcançou a estabilidade das suspensões após as primeiras doze horas da preparação e assim, se manteve até o final das 24 h, já o lote 2, alcançou a estabilidade das suspensões após as primeiras dezoito horas da preparação mantendo sua estabilidade até o final das 24 h. Em ambas as caracterizações do comportamento da dispersibilidade e da estabilidade do nanomaterial, é possível afirmar que a troca dos

meios pode ser realizada a cada 24 h. Dessa forma, os resultados *in vivo* obtidos demonstram que não houve viés de exposição em relação à decantação do material.

A mortalidade dos animais não foi influenciada pelas diferentes concentrações do PPy/*p*-TSA durante o período de exposição. De acordo com o TG236, para que um composto químico seja considerado tóxico, a taxa de mortalidade dos embriões deve ser $\geq 90\%$ até o final de 96 h de exposição (OECD). No entanto, embora a mortalidade não tenha sido um parâmetro que ateste a toxicidade do nanomaterial, houveram alterações significativas em diversos parâmetros avaliados *in vivo*, que sugerem efeitos adversos importantes de menor intensidade.

Em relação à taxa de eclosão, houve um aumento expressivo na eclosão dos embriões expostos a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA durante as 48 hpf, mostrando resultado dose-dependente. De acordo com dados da literatura, a maioria das NPs acaba influenciando uma eclosão tardia nos animais quando expostos a nanomateriais à base de carbono (Soares *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2015a). Contudo, é necessário frisar que o PPy/*p*-TSA mostrou-se, através de microscopia ótica e por FESEM, possuir biocompatibilidade com o tecido biológico, causando sua deposição no córion do embrião. Inicialmente havia a hipótese de que os embriões poderiam estar sobre efeito de hipóxia a partir do envelopamento do córion, e por tanto, o marcador de expressão gênica para *hif1-a* foi analisado. Interessantemente, não houve alteração na expressão deste gene, embora não seja possível descartar a hipótese de que o nanomaterial pode estar influenciando na atividade de enzimas proteolíticas secretadas pela glândula do *hatching* (Sano *et al.*, 2008; Trikić *et al.*, 2011) que ajudam a modificar a malhabilidade do córion, facilitando desta forma, a eclosão do animal por meio de movimentos espontâneos. Portanto, além do evento de eclosão ser avaliado em *screenings* de nanotoxicidade utilizando o *zebrafish*, o mecanismo pelo qual as NPs afetam a eclosão e a expressão de enzimas proteolíticas também deve ser levado em consideração.

As análises dos dados morfológicos demonstraram significativas alterações no comprimento do corpo e na distância ocular dos animais. Estes achados podem estar relacionados aos efeitos que as NPs exercem no desenvolvimento inicial dos embriões, principalmente através da produção de ROS, na interferência de transportadores de Na^+ - K^+ -ATPase ou mesmo através de efeitos genotóxicos diretos (Handy *et al.*, 2008; Scown *et al.*, 2010). A hipótese da produção de ROS a partir da exposição às NPs de

PPy/*p*-TSA e sua influência sobre dados morfológicos dos animais não deve ser desconsiderado. Através de ensaios bioquímicos foi possível verificar que a atividade da CAT diminuiu, sugerindo que a taxa de produção de peróxido de hidrogênio nestes animais expostos às NPs excedeu a capacidade de detoxificação da CAT e, conseqüentemente, pode ter resultado em estresse oxidativo (Adeyemi *et al.*, 2015). Por outro lado, na literatura há estudos mostrando que os níveis de GSH em um organismo exposto a contaminantes podem estar aumentado ou diminuído (Elia *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2010; Adeyemi *et al.*, 2015). Neste contexto, sugere-se que o conteúdo aumentado da GSH nos animais neste estudo expostos às maiores concentrações de PPy/*p*-TSA pode ser sugestivo de resposta temporal da capacidade de defesa antioxidante da GSH. Em conjunto com os dados encontrados para o estresse oxidativo nos ensaios bioquímicos, os dados relativos à expressão gênica também se mostraram alterados para os marcadores *gpx*, *sod1*, *sod2* e *cat*.

Vale ressaltar que os resultados comportamentais dos animais expostos a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA durante seis dias de exposição evidenciaram alterações no perfil da atividade locomotora. De acordo com Powers e colaboradores (2010) e Truong e colaboradores (2012), as alterações causadas pela toxicidade durante a embriogênese do *zebrafish* podem induzir anormalidades morfológicas, afetar o neurodesenvolvimento e o movimento (Powers *et al.*, 2010; Truong *et al.*, 2012). Com base nisso, é possível sugerir que as NPs de PPy/*p*-TSA podem estar contribuindo para a alteração da atividade locomotora destes animais. Em conjunto, observou-se que as larvas expostas por três dias a diferentes concentrações do polímero apresentaram marcações sugestivas de morte celular na porção caudal, no entanto, o grupo de animais expostos a maior concentração do polímero apresentou uma diminuição da atividade da MPO. De fato os resultados em relação ao perfil inflamatório são bastante intrigantes, uma vez que os animais expostos por seis dias a diferentes concentrações do nanomaterial não apresentaram alteração da expressão relativa dos genes para *Il-8*, *Il-1 β* e *Il-10* (resultados não apresentados), reforçando a característica temporal do processo inflamatório.

Por fim, considerando os resultados obtidos neste estudo, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas adicionais que possam elucidar as questões relativas aos potenciais riscos toxicológicos dos nanomateriais, principalmente em relação aos efeitos

do polímero PPy, visto que este biomaterial é um promissor candidato para futuras aplicações na área biomédica.

2. PERSPECTIVAS

- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em larvas de *zebrafish* após a exposição a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA, incluindo o malondialdeído (MDA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*), superóxido dismutase (SOD) e óxido nítrico (NO, do inglês: *nitric oxide*);
- Avaliar a distribuição *in vivo* do particulado de PPy/*p*-TSA em larvas de *zebrafish* por TEM;
- Avaliar o padrão de expressão de genes marcadores de inflamação e estresse oxidativo por RT-qPCR em larvas de *zebrafish* expostas a diferentes concentrações de PPy/*p*-TSA.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Adeyemi JA, Martins-Júnior AC, Barbosa Jr F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comp Bioche Phys Part C*. 2015 Jun-Jul;172-173:7-12.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Akkouch A, Shi G, Zhang Z, Rouabhia M. Bioactivating electrically conducting polypyrrole with fibronectin and bovine serum albumin. *J Biomed Mater Res*. 2010 Jan;92(1):221-31.
- Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide) poly(propylene oxide) poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: Thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Coll Surf A: Physicochem Eng Asp*. 1995 Mar;96(1-2):1-46.
- Alikacem N, Marois Y, Zhang Z, Jakubiec B, Roy R, King MW, *et al*. Tissue reactions to polypyrrole-coated polyester: a magnetic resonance relaxometry study. *Artif Organs*. 1999 Oct;23(10):910-9.
- Almeida JP, Chen AL, Foster A, Drezek R. *In vivo* biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;6(5):815-35.
- Alvarez-Mejia L, Morales J, Cruz GJ, Olayo MG, Olayo R, Díaz-Ruiz A, *et al*. Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Jul;26(7):209.
- Amidi M, Pellikaan HC, de Boer AH, Crommelin DJ, Hennink WE, Jiskoot W. Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008 Feb;68(2):191-200.
- Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Aug;101(35):12792-97.
- Ansari R. Polypyrrole conducting electroactive polymers: synthesis and stability studies. *J Chem*. 2006 Jun;3(4):186-201.
- Aoki T, Tanino M, Sanui K, Ogata N, Kumakura K. Secretory function of adrenal chromaffin cells cultured on polypyrrole films. *Biomaterials*. 1996 Oct;17(20):1971-4.
- Araujo AO, Botter JW, Carvalho JF, Verde EL. Construção de uma fonte de corrente e de uma sonda para medida de condutividade pelo método da sonda de quatro pontas. *Quim Nova*. 2003 Mar;26(5):754-56.
- Ateh DD, Navsaria HA, Vadgama P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. *J R Soc Interface*. 2006a Dec;3(11):741-52.
- Ateh DD, Vadgama P, Navsaria Ha. Culture of human keratinocytes on polypyrrole-based conducting polymers. *Tissue Eng*. 2006b Apr;12(4):645-55.
- Auguste DT, Armes SP, Brzezinska KR, Deming TJ, Kohn J, Prud'homme RK. pH triggered release of protective poly(ethylene glycol)-b-polycation copolymers from liposomes. *Biomater*. 2006 Apr;27(12):2599-608.
- Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH. Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2014 Jun;10(6):2341-53.
- Bendrea AD, Cianga L, Cianga I. Review paper: progress in the field of conducting polymers for tissue engineering applications. *J Biomater Appl*. 2011 Jul;26(1):3-84.

Beneventi D, Alila S, Boufi S, Chaussy D, Nortier P. Polymerization of pyrrole on cellulose fibres using a FeCl₃ impregnation- pyrrole polymerization sequence. *Cel.* 2006 Dec;13(6):725–34.

Bettinger CJ, Bruggeman JP, Misra A, Borenstein JT, Langer R. Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering. *Biomat.* 2009;30(17):3050-7.

Bhirde AA, Patel S, Sousa AA, Patel V, Molinolo AA, Ji Y, *et al.* Distribution and clearance of PEG-single-walled carbon nanotube cancer drug delivery vehicles in mice. *Nanomed.* 2010 Dec;5(10):1535-46.

Bousalem S, Mangeney C, Chehimi MM, Basinska T, Miksa B, Slomkowski S. Synthesis, characterization and potential biomedical applications of *N*-succinimidyl ester functionalized, polypyrrole-coated polystyrene latex particles. *Colloid Polym Sci.* 2004 Oct;282(12):1301-7.

Bousalem S, Yassar A, Basinska T, Miksa B, Slomkowski S, Azionne A, *et al.* Synthesis, characterization and biomedical applications of functionalized polypyrrole-coated polystyrene latex particles. *Polym Adv Technol.* 2003 Nov;14(11):820-5.

Boraschi D, Italiani P, Palomba R, Decuzzi P, Duschl A, Fadeel B, *et al.* Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. *Semin Immunol.* 2017 Dec;34(C):33-51.

Brahim S, Guisseppi-Elie A. Electroconductive hydrogels: electrical and electrochemical properties of polypyrrole-poly(HEMA) composites. *Electroanalysis.* 2005 Apr;17(7):556-70.

Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 Sep;175(3):191-99.

Brundo MV, Salvaggio A. Zebrafish or Danio rerio: A New Model in Nanotoxicology Study. In: BOZKURT, Y. *Recent Advances in Zebrafish Researches*. 1. ed. [S.l.]: IntechOpen, 1. cap. 7, p. 121-133. v. 1. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-zebrafish-researches>>. Acesso em: Janeiro 2019.

Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55 (4):611-22.

Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods.* 2013;10:1063-67.

Cabuk M, Alan Y, Yavuz M, Unal HI. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of biodegradable conducting polypyrrole-graft-chitosan copolymer. *J Ap Su Sc.* 2014 Nov;318(1):168-75.

Castano H, O'Rear EA, McFetridge PS, Sikavitsas VI. Polypyrrole thin films formed by admicellar polymerization support the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci.* 2004 Aug;4(8):785-94.

Cetiner S, Kalaoglu F, Karakas H, Sarac AS. Electrospun nanofibers of polypyrrole-poly(acrylonitrile-co-vinyl acetate). *Text Res J.* 2010 Apr;80(17):1784-92.

Chen L, Hu P, Zhang L, Huang S, Luo L, Huang C. Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Sci Chin Chem.* 2012 Oct;55(10):2209-16.

Chen MJ, Yin JF, Liang Y, Yuan S, Wang F, Song M, Wang H. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *J Aqua Tox.* 2016 Feb;174:54-60.

Chen Y, Hu X, Sun J, Zhou Q. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. *Nanotoxicol.* 2015a Feb;1-11.

Chen Y, Ren C, Ouyang S, Hu X, Zhou Q. Mitigation in multiple effects of graphene oxide toxicity in zebrafish embryogenesis driven by humic acid. *Environ Sci Tech*. 2015b Jul;49:10147-54.

Cheng J, Chan CM, Veca LM, Poon WL, Chan PK, Qu L, *et al*. Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;235:216-25.

Cheng J, Cheng SH. Influence of carbon nanotube length on toxicity to zebrafish embryos. *Int J Nanomed*. 2012;7:3731-39.

Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Tox Chem*. 2007 Oct;26(4):708-16.

Cho YC, Pak PJ, Joo YH, Lee HS, Chung N. *In vitro* and *in vivo* comparison of the immunotoxicity of single- and multi-layered graphene oxides with or without pluronic F-127. *Sci Rep*. 2016 Dec;6:1-13.

Chronakis IS, Grapenson S, Jakob A. Conductive polypyrrole nanofibers via electrospinning: electrical and morphological properties. *Polymer*. 2006 Feb;47(5):1597-603.

Corey JM, Lin DY, Mycek KB, Chen Q, Samuel S, Feldman EL, *et al*. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Dec;83(3):636-45.

Costa KM, Pereira TCB, Valente CA, Pissinate K, Soares JC, Cruz FF, *et al*. Adverse effects of p-TSA-doped polypyrrole particulate exposure during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Colloids Surf B*. 2019 Jan;177:58-67.

Cruz FF, Leite CE, Pereira TC, Bogo MR, Bonan CD, Battastini AM, *et al*. Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2013 Sep;158 (3):159-64.

Cucchi I, Boschi A, Arosio C, Bertini F, Freddi G, Catellani M. Bio-based conductive composites: Preparation and properties of polypyrrole (PPy)-coated silk fabrics. *Synth Met*. 2009 Feb;159(3-4):246-53.

Cui X, Wiler J, Dzaman M, Altschuler RA, Martin DC. *In vivo* studies of polypyrrole/peptide coated neural probes. *Biomater*. 2003 Feb;24(5):777-87.

Cui XY, Hetke JF, Wiler JA, Anderson DJ, Martin DC. Electrochemical deposition and characterization of conducting polymer polypyrrole/PSS on multichannel neural probes. *Sensor Actuat a-Phys*. 2001 Aug;93(1):8-18.

Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M, *et al*. Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Aug;215(1):100-08.

Dallas P, Georgakilas V. Interfacial polymerization of conductive polymers: Generation of polymeric nanostructures in a 2-D space. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015 Oct;224:46-61.

De Giglio E, Sabbatini L, Colucci S, Zambonin G. Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000;11(10):1073-83.

Deng S, Jia PP, Zhang JH, Junaid M, Niu A, Ma YB, *et al*. Transcriptomic response and perturbation of toxicity pathways in zebrafish larvae after exposure to graphene quantum dots (GQDs). *J Haz Mat*. 2018 May;357:146-58.

Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett*. 2004 Dec;4(1):11-18.

- Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol*. 2003 Jan;15(1):39-52.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med*. 2001a Mar;58:211-16.
- Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2001b Aug;109(Suppl 4):523-27.
- Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita*. 2003;39(3):405-10.
- Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Born PJ. Nanotoxicology. *Occup Environ Med*. 2004 Sep;61(9):727-28.
- Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, *et al*. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci*. 2006 Jul;92(1):5-22.
- Elia AC, Waller WT, Norton SJ. Biochemical responses of Bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2002 Jun;68(6):809-16.
- Esfafilzadeh D, Razal JM, Moulton SE, Stewart EM, Wallace GG. Multifunctional conducting fibres with electrically controlled release of ciprofloxacin. *J Control Release*. 2013 Aug 10;169(3):313-20.
- Fahlgren A, Bratengeier C, Gelmi A, Semeins CM, Klein-Nulend J, Jager EWH, *et al*. Biocompatibility of polypyrrole with human primary osteoblasts and the effect of dopants. *Plos One*. 2015 Jul;10(7):1-17.
- Farrera C, Fadeel B. It takes two to tango: understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015 Sep;95 (Pt A):3-12.
- Ferraz N, Stromme M, Fellstrom B, Pradhan S, Nyholm I, Mihranyan A. *In vitro* and *in vivo* toxicity of rinsed and aged nanocellulose-polypyrrole composites. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Aug;100(8):2128-38.
- Filho JS, Matsubara EY, Franchi LP, Martins IP, Rivera LMR, Rosolen JM, *et al*. Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Environ Res*. 2014 Jul;134:9-16.
- Fonner JM, Forciniti L, Nguyen H, Byrne JD, Kou YF, Syeda-Nawaz J, *et al*. Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. *Biomed Mater*. 2008 Sep;3(3):034124.
- Forciniti L, Ybarra J, Zaman MH, Schimdt CE. Schwann cell response on polypyrrole substrates upon electrical stimulation. *Acta Biomater*. 2014 Feb;10:2423-33.
- Garner B, Georgevich A, Hodgson AJ, Liu L, Wallace GG. Polypyrrole-heparin composites as stimulus-responsive substrates for endothelial cell growth. *J Biomed Mater Res*. 1999a Feb;44(2):121-9.
- Garner B, Hodgson AJ, Wallace GG, Underwood PA. Human endothelial cell attachment to and growth on polypyrrole-heparin is fibronectin dependent. *J Mater Sci Mater Med*. 1999b Jan;10(1):19-27.
- George PM, Lyckman AW, LaVan DA, Hegde A, Leung Y, Avasare R, *et al*. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomater*. 2005 Jun;26(17):3511-9.
- George PM, LaVan DA, Burdick JA, Chen CY, Liang E, Langer R. Electrically controlled drug delivery from biotin-doped conductive polypyrrole. *Adv Mater*. 2006 Mar;18(5):577-81.
- George PM, Saigal R, Lawlor MW, Moore MJ, LaVan DA, Marini RP, *et al*. Three-dimensional conductive constructs for nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Nov;91(2):519-27.

Ghasemi-Mobarakeh I, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Kiani S, Al-Deyab SS. Applications of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Jan;5:e17-35.

Gilbertson LM, Melnikov F, Wehmas LC, Anastas PT, Tanguay RL, Zimmerman JB. Toward safer multi-walled carbon nanotube design: establishing a statistical model that relates surface charge and embryonic. *Nanotox*. 2016 Feb;10(1):10-19.

Gilmore KJ, Kita M, Han Y, Gelmi A, Higgins MJ, Moulton SE, *et al*. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. *Biomater*. Oct 2009;30(29):5292-304.

Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, Vickers Ma, Drost EM, Ford I, *et al*. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;195:35-44.

Giroto EM, Santos IA. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: como efetuá-las corretamente. *Quim Nova*. 2002 Ago;25(4):639-47.

Goel S, Mazumdar NA, Gupta A. Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants. *Polym Advan Technol*. 2010 Mar;21(3):205-10.

Gomez N, Lee JY, Nickels JD, Schmidt CE. Micropatterned polypyrrole: a combination of electrical and topographical characteristics for the stimulation of cells. *Adv Funct Mater*. 2007 May;17(10):1645-53.

Gomez N, Schmidt CE. Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Apr;81(1):135-49.

Guimard NK, Gomez N, Schmidt CE. Conducting polymers in biomedical engineering. *Prog Polym Sci*. 2007 Aug;32:876-921.

Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects—pros and cons. *Environ Health Perspect*. 2006 Dec;114(12):1818-25.

Hahn MA, Singh AK, Sharma P, Brown SC, Moudgil BM. Nanoparticles as contrast agents for *in vivo* bioimaging: current status and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Jan;399(1):3-27.

Handy RD, von der Kammer F, Lead JR, Hasselov M, Owen R, Crane M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicol*. 2008 May;17(4):287-314.

Hansen JM, Harris C. Redox control of teratogenesis. *Reprod Toxicol*. 2013 Jan;35:165-79.

Harvie EA, Huttenlocher A. Neutrophils in host defense: new insights from zebrafish. *J Leuk Biol*. 2015 Oct;98:1-15.

Hartwell R, Leung V, Chavez-Munoz C, Nabai L, Yang H, Ko F, Ghahary A. A novel hydrogel-collagen composite improves functionality of an injectable extracellular matrix. *Acta Biomater*. 2011 Aug;7(8):3060-9.

Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salara OV. Nanoparticles – known and unknown health risks. *J Nanobiotechnol*. 2004 Dec;2(12):1-15.

Hofer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, *et al*. Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol*. 2004 Oct;78(10):549-64.

Hu YL, Gao JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int J Pharm*. 2010 Jul;394(1-2):115-21.

- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006 Oct;3(10):589-601.
- Isama K. *In vitro* safety evaluation of nanomaterials-cellular response to metal oxide nanoparticles. *Yakugaku Zasshi, J Pharm Soc Jpn*. 2014;134(6):731-35.
- Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol*. 1990 Dec;42(12):821-26.
- Jiang X, Marois Y, Traore A, Tessier D, Dao LH, Guidoin R, *et al*. Tissue reaction to polypyrrole-coated polyester fabrics: an *in vivo* study in rats. *Tissue Eng*. 2002 Aug;8(4):635-47.
- Jin Y, Zhang X, Shu L, Chen L, Sun L, Qian H, *et al*. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemos*. 2010 Feb;78(7):846-52.
- Johnson BN, Lancaster KZ, Zhen G, He J, Gupta MK, Kong YL, *et al*. 3D Printed Anatomical Nerve Regeneration Pathways. *Adv Funct Mater*. 2015 Oct;25(39):6205-17.
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.
- Kang YF, Li YH, Fang YW, Xu Y, Wei XM, Yin XB. Carbon quantum dots for zebrafish fluorescence imaging. *Sci Rep*. 2015 Jul;5:1-12.
- Khan Y, Garg M, Gui Q, Schadt M, Gaikwad A, Han D, *et al*. *Adv Funct Mat*. 2016;sup-1.
- Kharlampieva E, Kozlovskaya V, Tyutina J, Sukhishvili SA. Hydrogen-bonded multilayers of thermoresponsive polymers. *Macromol*. 2005 Nov;38(25):10523-31.
- Kim DH, Richardson-Burns SM, Hendricks JL, Sequera C, Martin DC. Effect of immobilized nerve growth factor on conductive polymers: electrical properties and cellular response. *Adv Funct Mater*. 2007 Nov;17(1):79-86.
- Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, *et al*. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*. 2004 Dec;22:93-97.
- Kim S, Oh WK, Jeong YS, Hong JY, Cho BR, Hahn JS, *et al*. Cytotoxicity of, and immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. *Biomater*. 2011;32(9):2342-50.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TT. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995 Jul;203(3): 253–310.
- Kosmehl T, Otte JC, Yang L, Legradi J, Bluhm K, Zinsmeister C, *et al*. A combined DNA-microarray and mechanism-specific toxicity approach with zebrafish embryos to investigate the pollution of river sediments. *Reprod Toxicol*. 2012 Apr;33(2):245-53.
- Kotwal A, Schmidt CE. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomater*. 2001 May;22(10):1055-64.
- Kreyling WG, Semmier-Behnke M, Seitz J, Scymczak W, Wenk A, Mayer P, *et al*. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol*. 2009 Jul;21(1):55-60.
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-walled carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*. 2004 Jan;77(1):126-34.
- Lakard S, Herlem G, Propper A, Kastner A, Michel G, Vallès-Villarreal N, *et al*. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. *Bioelectrochem*. 2004 Apr;62 (1):19-27.

- Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*. 2009 Sep;30(26):4325-35.
- Lee JW, Serna F, Nickels J, Schmidt CE. Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion. *Biomacromolecules*. 2006 Jun;7(6):1692-5.
- Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, também denominada Lei Arouca (BRASIL, 2008). Disponível em: <http://www.sbc.al.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=41>. Acesso em: Janeiro 2019.
- Leite CE, Maboni LO, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TCB, *et al.* Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by Cooper in zebrafish larvae. *J Tox App Pharmacol*. 2013 Aug;272:681-89.
- Lessman CA. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011 Sep;93(3):268-80.
- Li Y, Neoh KG, Kang ET. Plasma protein adsorption and thrombus formation on surface functionalized polypyrrole with and without electrical stimulation. *J Colloid interf Sci*. 2004 Jul;275(2):488-95.
- Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J Biol Chem*. 2003 Aug;278(34):31998-32004.
- Liu X, Chen J, Gilmore KJ, Higgins MJ, Liu Y, Wallace GG. Guidance of neurite outgrowth on aligned electrospun polypyrrole/poly(styrene-beta-isobutylene-beta-styrene) fiber platforms. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Sep;94(4):1004-11.
- Liu XT, Mu XY, Wu XL, Meng LX, Guan WB, Ma YQ, *et al.* Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos. *Biomed Environ Sci*. 2014 Jan;27(9):676-83.
- Liu Y, Liu X, Chen J, Gilmore KJ, Wallace GG. 3D bio-nanofibrous PPy/SIBS mats as platforms for cell culturing. *Chem Commun (Camb)*. 2008 Aug;28(32):3729-31.
- Love B. Polymeric Biomaterials. *Biomater*. 2017;205-38.
- Lundin V, Herland A, Berggren M, Jager EW, Teixeira AJ. Control of neural stem cell survival by electroactive polymer substrates. *Plos One*. 2011 Apr;6(4):e18624.
- Manjunatha B, Park SH, Kim K, Kundapur RR, Lee SJ. *In vivo* toxicity evaluation of pristine graphene in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 May;25(13):12821-12829.
- Mann A, Sáez-Martínez V, Lydon F, Tighe B. Investigating the permeation properties of contact lenses and its influence on tear electrolyte composition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Dec;1-9.
- Marroni NP, *et al.*, Radicais livres no processo saúde-doença: da bancada à clínica. Curitiba: Editora CRV, 2012.
- Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):616-19.
- Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Brit Jour Pharmacol*. 2007 Jan;150:552-58.
- Meng S, Rouabhia M, Shi G, Zhang Z. Heparin dopant increases the electrical stability cell adhesion and growth of conducting polypyrrole/poly(L,L-lactide) composites. *J Biomed Mater Res* 2008 Nov;87(2):332-44.

- Mindroiu M, Ion R, Pirvu C, Cimpean A. Surfactant-dependent macrophage response to polypyrrole-based coatings electrodeposited on Ti6Al7Nb alloy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013a Aug;33(6):3353-61.
- Mindroiu M, Ungureanu C, Ion R, Pirvu C. The effect of deposition electrolyte on polypyrrole surface interaction with biological environment. *Appl Surf Sci*. 2013b Jul;276:401-10.
- Mindroiu VM, Pirvu C, Popescu S, Demetrescu I. Polypyrrole electrodeposition on Ti6Al7Nb alloy in aqueous and non-aqueous solutions. *Rev Chim*. 2010 Apr;61(4):390-94.
- Mirfakhrai T, Madden JDW, Baughman RH. Polymer artificial muscles. *Mat Tod*. 2007;10(4):30-8.
- Missaoui WN, Arnold RD, Cummings BS. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. *Chem Bio Int*. 2018 Nov;295:1-12.
- Molina J, del Río AI, Bonastre J, Cases F. Electrochemical polymerisation of aniline on conducting textiles of polyester covered with polypyrrole/AQSA. *Europ Pol Jour*. 2009 Apr;45(4):1302-15.
- Moon C, Park HJ, Choi YH, Park EM, Castranova V, Kang JL. Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO₂) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2010;73(5):396-409.
- Muller D, Rambo CR, Recouvreux DOS, Porto LM, Barra GMO. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. *Synthetic Met*. 2011 Jan;161(1-2):106-11.
- Najar SS, Kaynak A, Foitzik RC. Conductive wool yarns by continuous vapour phase polymerization of pyrrole. *Synth Met*. 2007 Jan;157(1):1-4.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006 Feb;311:622-27.
- Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, *et al*. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002 Jan;105(4):411-14.
- Nguyen DN, Yoon H. Recent advances in nanostructured conducting polymers: from synthesis to practical applications. *Polymers*. 2016 Apr;8(4):118.
- Nguyen HT, Wei C, Chow JK, Nguy L, Nguyen HK, Schmidt CE. Electric field stimulation through a substrate influences Schwann cell and extracellular matrix structure. *J Neu Eng*. 2013 Jul;4(10):1-12.B
- Nicolson T. The genetics of hair-cell function in zebrafish. *J Neurogenet*. 2017 Sep;31(3): 102–12.
- Oberdörster G. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*. 2004 Jul;112(10):1058-62.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004 Jun;16(6-7):437-45.
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, *et al*. Principles for characterization the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*. 2005a Oct;2:8.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005b Jul;113(7):823-39.
- O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Tody*. 2011 March;14(3):88-95.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing, Paris.

- Oh KS, Han SK, Choi YW, Lee JH, Lee JY, Yuk SH. Hydrogen-bonded polymer gel and its application as a temperature-sensitive drug delivery system. *Biomater*. 2004 May;25(2):2393-98.
- Oh WK, Yoon H, Jang J. Size control of magnetic carbon nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(6):1342-8.
- Olivari FA, Hernandez PP, Allende ML. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res*. 2008 Dec;1244:1-12.
- Oliveira GMT, Oliveira EMN, Pereira TCB, Papaléo RM, Bogo MR. Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish. *J Nanopart Res*. 2017 Dec;19:389.
- Omastová M, Trchová M, Kovářová J, Stejskal J. Synthesis and structural study of polypyrroles prepared in the presence of surfactants. *Synth. Met*. 2003 Jul;138(3):447-55.
- Onar N, Akşit AC, Ebeoglugil MF, Birlik I, Celik E, Ozdemir I. Structural, electrical, and electromagnetic properties of cotton fabrics coated with polyaniline and polypyrrole. *Ap Pl Sci*. 2009 Nov;114(4):2003-10.
- O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. Mechanisms of disease JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *New Engl J Med*. 2013;368(2):161-70.
- Otero TF, Martinez JG, Pardilla JA. Biomimetic electrochemistry from conducting polymers. A review: Artificial muscles, smart membranes, smart drug delivery and computer/neuron interfaces. *Electrochim Acta*. 2012 Dec;84:112-28.
- Pan H, Lin YJ, Li MW, Chuang HN, Chou CC. Aquatic toxicity assessment of single-walled carbon nanotubes using zebrafish embryos. *J Phys Conf Ser*. 2011;304:012026.
- Pan Y, Leifert A, Graf M, Schiefer F, Thoröe-Boveleth S, Broda J, *et al*. High-sensitivity real-time analysis of nanoparticles toxicity in green fluorescent protein-expressing zebrafish. *Small*. 2013 Nov;9(6):863-69.
- Parrng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Tech*. 2002 Nov;1(1 Pt 1):41-48.
- Park HE, Lee PC, Macosko CW. Polymer-polymer interfacial slip by direct visualization and by stress reduction. *J Rheol*. 2010 Oct;54(6):1207-18.
- Patel H, Bonde M, Srinivasan G. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Trends Biomater Artif Organs*. 2011 Mar;25(1):20-9.
- Patil AJ, Pandey AK. A novel approach for in situ polymerization of polypyrrole on cotton substrates. *Indian J Fibre Text Res*. 2012 Jun;37:107-13.
- Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geser M, *et al*. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. Part Fibre Toxicol. 2006 Sep;3(13):1-13.
- Pires LR, Pêgo AP. Bridging the lesion-engineering a permissive substrate for nerve regeneration. *Regen Biomater*. 2015 Sep;2(3):203-14.
- Pomeroy MV, Brun NR, Peijnenburg WJGM, Vijver MG. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *J Aqua Tox*. 2017 Jun;190:40-45.

Popescu S, Pirvu C, Mindroiu M, Manole C, Demetrescu I. Electrochemical Synthesis and Characterization of Ti Modified Electrodes with Polypyrrole–Polyethylene Glycol Hybrid Coating. *Rev Chim.* 2010a Mar;61(3):245-48.

Popescu S, Pirvu C, Mindroiu M, Demetrescu I. Enhancing the Stability of PPy Film on Ti by PEG Incorporation. *Mol Cryst Liq Cryst.* 2010b May;522(1):425-35.

Powers CM, Yen J, Linney EA, Seidler FJ, Slotkin TA. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): Persistent effects on larval behavior and survival. *Neurotoxicol Teratol.* 2010 May-Jun;32(3):391-97.

Quigley AF, Razal JM, Thompson BC, Moulton SE, Kita M, Kennedy EL, *et al.* A conducting-polymer platform with biodegradable fibers for stimulation and guidance of axonal growth. *Adv Mater.* 2009 Nov;21(43):4393-7.

Radomski A, Jurasz P, Alonso-Escolano D, Drews M, Morandi M, Malinski T, *et al.* Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol.* 2005 Nov;146(6):882-93.

Ramanaviciene A, Kausaite A, Tautkus S, Ramanavicius A. Biocompatibility of polypyrrole particles: an *in vivo* study in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2007 Feb;59(2):311-5.

Ravichandran R, Sundarrajan S, Venugopal JR, Mukherjee S, Ramakrishna S. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *J R Soc Interface.* 2010;7:S559–S79.

REACH – Guidance on REACH and CPL implementation: Disponível em: <<http://guidance.echa.europa.eu/>>. Acesso em: Janeiro 2019.

Reddy ER, Banote RK, Chatti K, Kulkarni P, Rajadurai MS. Selective multicolour imaging of zebrafish muscle fibers by using fluorescent organic nanoparticles. *Chembiochem.* 2012 Sep;13:1889-94.

Ren C, Hu X, Li X, Zhou Q. Ultra-trace graphene oxide in a water environment triggers Parkinson's disease-like symptoms and metabolic disturbance in zebrafish larvae. *Biomater.* 2016 Mar;93:83-94.

Reung-U-Rai A, Prom-Jun A, Prissanaroon-Oujai W, Ouajai S. Synthesis of highly conductive polypyrrole nanoparticles via microemulsion polymerization. *J Met Mater Miner.* 2008 Jan;18(2):27-31.

Ribeiro J, Pereira T, Caseiro AR, Armada-da-Silva P, Pires I, Prada J, *et al.* Evaluation of biodegradable electric conductive tube-guides and mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2015 Jul;7(6):956-75.

Rivers TJ, Hudson TW, Schmidt CE. Synthesis of a novel, biodegradable electrically conducting polymer for biomedical applications. *Adv Funct Mater.* 2002 Jan;12:33-7.

Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, Saldaña-Koppel DA, Quiñones-Olvera LF. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int.* 2015 Oct;821279.

Rola RC, Marins LF, Nery LUM, Rosa CE, Sandrini JZ. Responses to ROS inducer agents in zebrafish cell line: differences between copper and UV-B radiation. *Fish Physiol Biochem.* 2014 Aug;40:1817-25.

Runge MB, Dadsetan M, Baltrusaitis J, Knight AM, Ruesink T, Lazcano EA, *et al.* The development of electrically conductive polycaprolactone fumarate-polypyrrole composite materials for nerve regeneration. *Biomater.* 2010 Aug;31(23):5916-26.

Ryu HJ, Seo MY, Jung SK, Maeng EH, Lee SY, Jang DH, *et al.* Zinc oxide nanoparticles: a 90-day repeated-dose dermal toxicity study in rats. *Int J Nanomed.* 2014 Dec;9(2):137-44.

- Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, *et al.* Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Feb;161(2 Pt 1):550-57.
- Sant KE, Hansen JM, Williams LM, Tran NL, Goldstone JV, Stegeman JJ, *et al.* The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. *Redox Biol.* 2017 May;13:207-18.
- Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M, Yoshizaki N, Iuchi I, Yasumasu S. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme – an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS Jour.* 2008;275:5934–46.
- Sassa-deepaeng T, Pikulkaew S, Okonogi S. Development of chrysin loaded poloxamer micelles and toxicity evaluation in fish embryos. *Drug Discover Therap.* 2016 Jun;10(3):150-55.
- Sayes C, Fortner J, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman KD, *et al.* The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett.* 2004 Sep;4(10):1881-87.
- Sayyah SM, Mohamed F, Shaban M. Antibacterial activity of nano fabricated polypyrrole by cyclic voltammetry. *J Ap Chem.* 2014 Mar-Apr;7(2):11-15.
- Seabra AB, Paula AJ, Lima R, Alves OL, Durán N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem Res Toxicol.* 2014 Jan;27(2):159-68.
- Semberova J, De Paoli Lacerda SH, Simakova O, Holada K, Gelderman MP, Simak J. Carbon nanotubes activate blood platelets by inducing extracellular Ca²⁺ influx sensitive to calcium entry inhibitors. *Nano Lett.* 2009 Sep;9(9):3312-17.
- Schirmer L, Atallah P, Werner C, Freudenberg U. StarPEG-Heparin Hydrogels to Protect and Sustainably Deliver IL-4. *Adv Healthc Mater.* 2016 Dec;5(24):3157-64.
- Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):8948-53.
- Schmolka I. A review of block polymer surfactants. *J Am Oil Chem soc.* 1977 Mar;54(3):110-16.
- Schreiber R, Altenburger R, Paschke A, Schuurmann G, Kuster E. A novel *in vitro* system for the determination of bioconcentration factors and the internal dose in Zebrafish (*Danio rerio*) eggs. *Chemosphere.* 2009 Nov;77(7):928-33.
- Scown TM, van Aerle R, Tyler CR. Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Crit Rev Toxicol.* 2010 Aug;40(10):653-70.
- Sensharma P, Madhumathi G, Jayant Rahul D, Jaiswal Amit K. Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices. *Mat Sci Engi C.* 2017 Mar;77:1302-15.
- Seo JWT, Green AA, Antaris AL, Hersam MC. High-concentration aqueous dispersions of graphene using nonionic, biocompatible block copolymers. *J Phys Chem Lett.* 2011 Apr;2(9):1004-08.
- Serizawa T, Matsukuma D, Akashi M. Loading and release of charged dyes using ultrathin hydrogels. *Lang.* 2005 Jul;21(17):7739-42.
- Shapira P, Wang J. Follow the money. *Nature.* 2010 Dec;468(7324):627-28.
- Shi G, Rouabhia M, Wang Z, Dao LH, Zhang Z. A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide. *Biomaterials.* 2004 Jun;25(13):2477-88.

- Shim JY, Kim MH, Kim HD, Ahn JY, Yun YS, Song JY, *et al.* Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Feb;242(3):318-25.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, *et al.* Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2003 Oct;66(20):1909-26.
- Shyamasundar S, Ng CT, Yung LY, Dheen ST, Bay BH. Epigenetic mechanisms in nanomaterial-induced toxicity. *Epigenomics.* 2015;7(3):395-411.
- Sierra MI, Valdes A, Fernandez AF, Torrecillas R, Fraga MF. The effect of exposure to nanoparticles and nanomaterials on the mammalian epigenome. *Int J Nanomed.* 2016 Nov;11:6297-6306.
- Sirivisoot S, Pareta R, Webster TJ. Electrically controlled drug release from nanostructured polypyrrole coated on titanium. *Nanotech.* 2011 Feb 25;22(8):085101.
- Smolkova B, El Yamani N, Collins AR, Gutleb AC, Dusinska M. Nano particles in food. Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. *Food Chem Toxicol.* 2015 Mar;77:64-73
- Soares JC; Pereira TCB; Costa KM; Maraschin T, Basso NR, Bogo MR. Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Colloids Surf B.* 2017 Jun;157:335-46.
- Song HK, Toste B, Ahmann K, Hoffman-Kim D, Palmore GTR. Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: a new platform for characterize neurite extension in complex environments. *Biomaterials.* 2006 Aug;27(3):473-84.
- Stauffer WR, Cui XT. Polypyrrole doped with 2 peptide sequences from laminin. *Biomater.* 2006 Apr;27(11):2405-13.
- Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci.* 2009 Nov;16(108):1-11.
- Suslick KS, Flannigan DJ. Inside a collapsing bubble: Sonoluminescence and the conditions during cavitation. *Annu Rev Phys Chem.* 2008;59:659-83.
- Szentkuti L. Light microscopical observations on luminally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the pre-epithelial mucus gel layer of the rat distal colon. *J Control Release.* 1997 Jun;46(3):233-42.
- Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39:384-90.
- Tang M, Song Q, Li N, Jiang Z, Huang R, Cheng G. Enhancement of electrical signaling in neuronal networks on graphene films. *Biomater.* 2013 Sep;34(27):6402-11.
- Teo AJT, Mishra A, Park I, Kim YJ, Park WT, Yoon YJ. Polymeric biomaterials for medical implants and devices. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016 Feb.
- Thompson BC, Moulton SE, Richardson RT, Wallace GG. Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein. *Biomater.* 2011 Feb;32:3822-31.
- Tian HY, Tang ZH, Zhuang XL, Chen XS, Jing XB. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science.* 2012 Feb;37(2):237-80.

Tkach VV, Nechyporuk VV, Yagodynets PI, Slipenyuk OT. The mathematical investigation of electrochemical synthesis of polyheterocyclic compounds in strong acid media. *Quim Mat.* 2013 Jan;3(4):47-54.

Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K. Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal Toxicol.* 2000 Dec;12(12):1113-26.

Trikic´ MZ, Monk P, Roehl H, Partridge LJ. Regulation of Zebrafish Hatching by Tetraspanin cd63. *Plos One.* 2011 May;6(5):e19683.

Truong L, Saili KS, Miller IM, Hutchinson JE, Tanguay RL. Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2012 Mar;155(2):269-74.

Tucker B, Lardelli M. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Zebrafish.* 2007 Aug;4(2):113-17.

Tu Q, Pang L, Wang L, Zhang Y, Zhang R, Wang J. Biomimetic choline-like graphene oxide composites for neurite sprouting and outgrowth. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013 Nov;5(24):13188-97.

Unger F, Westedt U, Hanefeld P, Wombacher R, Zimmermann S, Greiner A, et al. Poly(ethylene carbonate): A thermoelastic and biodegradable biomaterial for drug eluting stent coatings? *Jour Control Rel.* 2007 Feb;117 (3):312-21.

Ungureanu C, Popescu S, Purcel G, Tofan V, Popescu M, Salageanu A, *et al.* Improved antibacterial behavior of titanium surface with torularhodin-polypyrrole film. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Sep;42:726-33.

Vaitkuviene A, Kaseta V, Voronovic J, Ramanauskaite G, Biziuoleviciene G, Ramanaviciene A, *et al.* Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization. *Jour Hazard Mat.* 2013 Feb;250-251:167-74.

Vaitkuviene A, Ratautaite V, Mikoliunaite L, Kaseta V, Ramanauskaite G, Biziuoleviciene G, *et al.* Some biocompatibility aspects of conducting polymer polypyrrole evaluated with bone marrow-derived stem cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects.* 2014 Jun;442:152-56.

Varesano A, Aluigi A, Florino L, Fabris R. Multifunctional cotton fabrics. *Synth Met.* 2009 Jun;159(11):1082-89.

Varesano A, Vineis C, Aluigi A, Rombaldoni F, Tonetti C, Mazzuchetti G. Antibacterial efficacy of polypyrrole in textile application. *Fib Pol.* 2013 Jan;14(1):36-42.

Xia X, J. Yin, P. Qiang, X. Zhao. Electrorheological properties of thermo-oxidative polypyrrole nanofibers. *Polymer.* 2011 Feb;52(3):786-92.

Xie J, Macewan MR, Willerth SM, Li X, Moran DW, Sakiyama-Elbert SE, *et al.* Conductive Core-Sheath Nanofibers and Their Potential Application in Neural Tissue Engineering. *Adv Funct Mater.* 2009 Jul;19(14):2312-8.

Zhang H, Wang K, Xing Y, Yu Q. Lysine-doped polypyrrole/spider silk protein/poly(l-lactic) acid containing nerve growth factor composite fibers for neural application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Nov;56:564-73.

Zhang L, Xia J, Zhao Q, Liu L, Zhang Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small.* 2010 Feb;6(4):537-44.

Zhang X, Manohar SK. Bulk synthesis of polypyrrole nanofibers by a seeding approach. *J Am Chem Soc.* 2004 Sep;126(40):12714-5.

Zhang Z, Rouabhia M, Wang Z, Roberge C, Shi G, Roche P, *et al.* Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artif Organs.* 2007 Jan;31(1):13-22.

Zhu X, Tian S, Cai Z. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One.* 2012 Sep;7(9):e46286.

Wadhwa R, Lagenaur CF, Cui XT. Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode. *J Control Rel.* 2006 Feb 21;110(3):531-41.

Wang HL, Fernandez JE. Conducting polymer blends: polypyrrole and poly(vinyl methyl ketone). *Macromol.* 1992 Nov;25(23):6179-84.

Wang J, Zhu X, Zhang X, Zhao Z, Liu H, George R, *et al.* Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO₂ nanoparticles. *Chemosphere* 2011 Apr;83(4):461-67.

Wang R, Hughes T, Beck S, Vakil S, Li S, Pantano P, *et al.* Generation of toxic degradation products by sonication of Pluronic[®] dispersants: implications for nanotoxicity testing. *Nanotox.* 2013 Nov;7:1272-81.

Wang R, Meredith AN, Lee M, Deutsch D, Miadzvedskaya L, Braun E, *et al.* Toxicity assessment and bioaccumulation in zebrafish embryos exposed to carbon nanotubes suspended in Pluronic[®] F-108. *Nanotox.* 2016 Aug;10(6):689-98.

Wang X, Gu X, Yuan C, Chen S, Zhang P, Zhang T, *et al.* Evaluation of biocompatibility of polypyrrole *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Mar;68(3):411-22.

Wang X, Gu X, Yuan C, Chen S, Zhang P, Zhang T, *et al.* Evaluation of biocompatibility of polypyrrole *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res A.* 2004a Mar 1;68(3):411-22.

Wang ZG, Zhou R, Jiang D, Song JE, Xu Q, Si J, *et al.* Toxicity of graphene quantum dots in zebrafish embryo. *Biomed Environ Sci.* 2015 Apr;28(5):341-51.

Warheit DB, Sayes CM, Frame SR, Reed KL. Pulmonary exposure to Sepiolite nanoclay particulates in rats: resolution following multinucleate giant cell formation. *Toxicol Lett.* 2010 Feb;192(3):286-93.

Weil T, Barz M. From Polymers to Functional Biomaterials. *Macromol Biosc.* 2017;17:1-4.

Westerfield M. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). *THE ZEBRAFISH BOOK.* 2007; 5th Edition.

Williams RL, Doherty PJ. A Preliminary Assessment of Poly(Pyrrole) in Nerve Guide Studies. *J Mater Sci-Mater M.* 1994 Jun-Jul;5(6-7):429-33.

Win-Shwe TT, Yamamoto S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Nov;209(1):51-61.

Win-Shwe TT, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett.* 2006 May;163(2):153-60.

Win-Shwe TT, Fujimaki H. Nanoparticles and neurotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2011 Sep;12:6267-80.

Wojtoniszak M, Chen X, Kalenczuk RJ, Wajda A, Lapczuk J, Kurzewski M, *et al.* Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *J Col Sur B* 2012 Jan;89(1):79-85.

Wong JY, Langer R, Ingber DE. Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):3201-4.

Wu T, Tang M. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. *J Appl Toxicol*. 2018 Jan;38(1):25-40.

Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu N, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: $O_2^{\cdot-}$. *J Am Chem Soc*. 2003 Oct;125(42):12803-09.

Yamawaki H, Iwai N. Mechanisms underlying nano-sized air-pollution-mediated progression of atherosclerosis: carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. *Circ J*. 2006 Jan;70(1):129-40.

Yang K, Hu L, Ma X, Ye S, Cheng L, Shi X, *et al*. Multimodal imaging guided photothermal therapy using functionalized graphene nanosheets anchored with magnetic nanoparticles. *Adv Mater*. 2012 Feb;24(14):1868-72.

Yang K, Lee J, Lee JS, Kim D, Chang GE, Seo J, *et al*. Graphene oxide hierarchical patterns for the derivation of electrophysiologically functional neuron-like cells from human neural stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Jun;8(28):17763-74.

Yang X, Yang Q, Zheng G, Han S, Zhao F. Developmental neurotoxicity and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish embryos. *Environ Toxicol*. 2018 Nov;1-9.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais

ANEXO B – Requisitos Obrigatórios e Atividades Adicionais (2015 – 2019)

Anexo A

Carta de Aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais.

CEUA/PUCRS/2015



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 93/2015 - CEUA

Porto Alegre, 19 de novembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

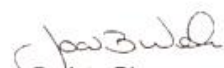
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00479 intitulado **“Avaliação da Biocompatibilidade do particulado e das Nanofibras de Polipirrol utilizando zebrafish (Danio rerio) como organismo modelo”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
9.800	Danio rerio	03/2015 – 02/2019

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

Anexo B

Requisitos Obrigatórios e Atividades Adicionais (2015 – 2019)

ANEXO B

Requisitos Obrigatórios e Atividades Adicionais (2015 – 2019)

I. Cumprimento dos Requisitos Obrigatórios para Doutorado no PPGMCS/PUCRS

- ❖ Publicação do artigo do mestrado (2014)
- ❖ Conclusão dos 36 créditos através de disciplinas eletivas e obrigatórias (2016)
- ❖ Execução de estágio docente, por um semestre, na disciplina de Bioquímica Estrutural do curso de Ciências Biológicas da FABIO/PUCRS (2016/A)
- ❖ Aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/PUCRS - Protocolo #15/00479)
- ❖ Publicação de artigo original como primeiro autor em tema diretamente relacionado à tese: revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (qualis A2)

II. Atividades Relacionadas ao Processo de Doutorado

IIa. Participação em Autoria e Co-autoria de Artigos Científicos

- ❖ 2017 – Soares JC, Pereira TCB, Costa KM, Maraschin T, Basso NR, Bogo MR. “Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*)”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017 Sep;157:335-46.
- ❖ 2018 – Costa KM, Fernandes FB, Ardenghi PG. “Hematological alterations, antiretroviral therapy and physical exercise: impact on seropositive patient”. *Brazilian Journal of Clinical Analyses*. 2018;50(2 supl.2):S60-9.
- ❖ 2018 – Filippini HF, Scalzilli PA, Costa KM, Freitas RDS, Campos MM. “Activation of trigeminal ganglion satellite glial cells in CFA-induced tooth pulp pain in rats”. *Plos One*. 2018 Nov;13(11): e0207411.

- ❖ Submetido – Nazario L, Souza J, Schroeder F, Costa KM, Oliveira GMT, Bogo MR, Silva R. “Ecto-5’-nucleotidase activity from adult zebrafish (*Danio rerio*) submitted to endotoxin”. *Toxicologic Pathology*, 2019.
- ❖ Submetido – Bello MDC, Michelon C, Tiburcio C, Mello J, Costa KM, Barin L, Danesi C, Bier A. “Inflammatory and oxidative stress findings of zoledronic acid in osteoporotic rats with periapical lesion”. *Brazilian Dental Journal*, 2019.

I Ib. Premiações relacionadas ao projeto de pesquisa durante o doutorado

- ❖ 2016 – Menção honrosa em apresentação de pôster na categoria Pós-graduação, Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental/SBFTE.
- ❖ 2018 – Menção honrosa em apresentação de pôster na categoria Pós-graduação, V Simpósio Zebrafish como Modelo Animal de Pesquisa.
- ❖ 2018 – Concurso Fotográfico de melhor fotografia em Pesquisa, III Congresso Internacional sobre Nanotecnologia/CINA.

IIIc. Participação em Congressos, Simpósios e Apresentação de Pôster relacionadas ao projeto de pesquisa durante o doutorado

- ❖ 2019 – XVI Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular, Ribeirão Preto/SP.
- ❖ 2018 – V Simpósio Zebrafish como Modelo Animal de Pesquisa, Natal/RN.
- ❖ 2018 – III Congresso Internacional sobre Nanotecnologia & VI Simpósio sobre Nanobiotecnologia e suas Aplicações, Novo Hamburgo/RS.
- ❖ 2018 – 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlim/Alemanha.
- ❖ 2018 – 1st TERMIS AM Workshop, Porto Alegre/RS.
- ❖ 2018 – II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, Porto Alegre/RS.
- ❖ 2017 – 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Ribeirão Preto/SP.
- ❖ 2017 – XVI Brazilian Materials Research Society Meeting, Gramado/RS.

- ❖ 2016 – 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), Foz do Iguaçu/PR.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br