

Rafael Augusto Nóbrega

“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS DE PRATA E OURO ANCORADAS COM POLOXAMER-P407 (Ag/AuNP-P407) E INTERAÇÃO COM O VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararaca*”

RESUMO

As nanopartículas (NPs) têm sido estudadas em diversas áreas da saúde e utilizadas principalmente em dispositivos biomédicos. Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar o potencial farmacológico de nanopartículas bimetálicas de prata e ouro ancoradas com Poloxamer-P407 (Ag/AuNP-P407) contra os efeitos tóxicos - bloqueio neuromuscular e miotoxicidade - induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*; 2) avaliar a toxicidade das nanopartículas obtidas pelo ensaio *Salmonella*/microsoma. O delineamento experimental foi tanto *ex vivo* em preparações isoladas de camundongos, utilizando-se técnica miográfica convencional, como *in vitro* em bactérias. No primeiro, utilizaram-se modelos farmacológicos de pré-incubação e pós veneno, seguido de microscopia de luz das preparações neuromusculares resultantes. Esses ensaios foram comparados estatisticamente com controles (Tyrode, veneno e Ag/AuNP-P407) e considerados significativos para valores com $p < 0,05$ (Anova One-way seguido do teste de Tukey ou Student's t-test). A avaliação de toxicidade foi realizada em cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella* Typhimurium auxotróficas para o aminoácido histidina, em triplicata, com e sem ativação metabólica. O ensaio-teste foi comparado estatisticamente com controle positivos, negativos e espontâneos através do programa estatístico Origin e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. A mutagenicidade foi atribuída a valores com índice de mutagenicidade, IM $\geq 2,0$. Os resultados obtidos destacam que o efeito de Ag/AuNPs-P407 em diferentes volumes (5, 10, 20 e 30 μL) sobre a resposta contrátil neuromuscular e a integridade celular. A preparação com 10 μL mostrou maior estabilidade contrátil e ação sinérgica na inibição da resposta promovida pelo veneno botrópico. O volume de 20 μL ofereceu proteção neuromuscular superior, preservando células normais e reduzindo a presença de células necróticas e *ghost*. Pré-incubações mostraram melhor desempenho na proteção celular comparadas ao modelo pós veneno. A miotoxicidade foi alta em todos os protocolos, mesmo com respostas contráteis preservadas. Ensaio *Salmonella*/microsoma indicaram proliferação bacteriana exacerbada em todas as concentrações testadas. A interação entre veneno e NPs foi essencial para a ação protetora. Conclui-se que o estudo demonstrou ação neurobloqueadora do veneno botrópico na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, causando bloqueio de 50% em 120 minutos. As nanopartículas Ag/AuNPs-

P407 apresentaram efeitos dependentes do volume: volumes menores (5 e 10 μL) estabilizaram ou potencializaram a resposta contrátil, enquanto volumes maiores (20 μL) reduziram a estabilidade. A pré-incubação com 20 μL atenuou o efeito neurobloqueador do veneno, mas volumes menores (10 μL) foram ineficazes e reduziram a resposta contrátil. No protocolo de pós-exposição, 20 μL não ofereceram proteção significativa.

Palavras-chave: junção neuromuscular; nanopartículas bimetálicas de prata e ouro; *Salmonella*/microssoma; veneno de *Bothrops jararaca*.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) have been widely studied in various health-related fields and are primarily used in biomedical devices. The objectives of this study were: (1) to evaluate the pharmacological potential of bimetallic silver and gold nanoparticles anchored with Poloxamer-P407 (Ag/AuNP-P407) against the toxic effects—namely neuromuscular blockade and myotoxicity—induced by *Bothrops jararaca* venom; and (2) to assess the toxicity of the nanoparticles using the *Salmonella*/microsome assay. The experimental design included both *ex vivo* assays in isolated mouse preparations, using conventional myography techniques, and *in vitro* assays in bacteria. The former employed pre-incubation and post-venom pharmacological models, followed by light microscopy analysis of the resulting neuromuscular preparations. These experiments were statistically compared to controls (Tyrode, venom, and Ag/AuNP-P407), with significance considered at $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey's test). Toxicity evaluation was conducted using TA97a, TA98, TA100, and TA102 strains of *Salmonella* Typhimurium auxotrophic for the amino acid histidine, in triplicate, with and without metabolic activation. The test assay was statistically compared to positive, negative, and spontaneous controls using Origin software, and values with $p < 0.05$ were considered significant. Mutagenicity was assigned to results with a mutagenicity index (MI) ≥ 2.0 .

The results highlight that Ag/AuNP-P407, in varying volumes (5, 10, 20, and 30 μL), affected neuromuscular contractile responses and cellular integrity. The 10 μL volume demonstrated greater contractile stability and synergistic inhibition of venom-induced effects. The 20 μL volume provided superior neuromuscular protection, preserving normal cells and reducing necrotic and ghost cells. Pre-incubation protocols yielded better cellular protection compared to post-venom models. High myotoxicity was observed across all protocols, even when contractile responses were preserved. *Salmonella*/microsome assays indicated exacerbated bacterial proliferation at all tested concentrations. The interaction between venom and NPs was

essential for the protective effect. In conclusion, the study demonstrated a neuroblocking effect of *Bothrops jararaca* venom at a concentration of 50 µg/mL, resulting in 50% blockade within 120 minutes. The Ag/AuNP-P407 nanoparticles exhibited volume- dependent effects: lower volumes (5 and 10 µL) stabilized or enhanced contractile responses, while higher volumes (20 µL) reduced stability. Pre- incubation with 20 µL attenuated the venom's neuroblocking effect, whereas smaller volumes (10 µL) were ineffective and reduced contractile response. In the post-exposure protocol, 20 µL did not provide significant protection.

Keywords: neuromuscular junction; bimetallic silver and gold nanoparticles; *Salmonella*/microsome; *Bothrops jararaca* venom.