**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

MAYARA KLIMUK UCHIYAMA

**Estudo de nanopartículas de ouro e de magnetita
voltadas para medicina diagnóstica**

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

15/06/2015

MAYARA KLIMUK UCHIYAMA

Estudo de nanopartículas de ouro e de magnetita voltadas
para medicina diagnóstica

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Química)

Orientador: Prof. Dr. Koiti Araki

Co-Orientador: Prof. Dr. Walter Colli

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

U17e	<p>Uchiyama, Mayara Klimuk</p> <p>Estudo de nanopartículas de ouro e de magnetita voltadas para medicina diagnóstica / Mayara Klimuk Uchiyama. -- São Paulo, 2015.</p> <p>222p.</p> <p>Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.</p> <p>Orientador: Araki, Koiti</p> <p>Co-orientador: Colli, Walter</p> <p>1. Química bioinorgânica 2. Materiais nanoestruturados I. T. II. Araki, Koiti, orientador. III. Colli, Walter, co- orientador.</p> <p>546.3 CDD</p>
------	--

Dedico esta Tese a Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Quero iniciar meu agradecimento àquele que é mais importante em minha vida: Deus. Sem Ele eu não existiria, não estaria aqui e nunca teria alcançado esse título tão importante. Ele me criou com um propósito e estou aqui cumprindo-o. Foi Ele quem me deu inteligência e quem me capacitou para fazer tudo o que fiz, mas antes disso colocou no meu coração esse sonho de ser cientista. Ciência e Religião parecem coisas opostas, mas é incrível como minha fé aumenta cada vez mais que aprendo ou descubro novas coisas, pois sua criação é perfeita e totalmente admirável. Meu papel como cientista é desvendar mistérios criados por Deus ocultos na natureza. Mesmo que eu vivesse uma vida de dedicação a Ele, isso não seria suficiente para agradecer por todas as coisas que Ele fez, tem feito e fará por mim.

Quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Koiti Araki (LQSN-IQ-USP). Nunca conseguirei expressar aqui minha gratidão a ele, pois seu papel foi muito além de um simples orientador. Considero-o meu amigo e também como um pai pra mim. Agradeço pela valiosa orientação, pois quando cheguei há 8 anos atrás, não passava de uma menininha curiosa e com vontade de fazer ciência! Nem relatório em sabia fazer. Sou muito grata por toda a paciência que teve e por sua porta estar SEMPRE aberta, não importando o motivo da minha visita. Seu incentivo e apoio foram fundamentais, pois tanto na ciência quanto na vida, houveram e sempre haverão altos e baixos, mas ele estava sempre ali, no momento exato e com as palavras certas, disposto a me levantar e a me ajudar de novo a longa e árdua caminhada. Tantos conselhos, tantas ideias, tantos sonhos... foi um privilégio estar ao lado de um homem como esse. Espero um dia estar à altura, não só em conhecimento científico, mas de vida também.

Agradeço também ao meu co-orientador Prof. Dr. Walter Colli (Bioquímica-IQ-USP). Ele também não foi somente um orientador, mas alguém que me ensinou muito mais do que

ciência. Agradeço pela valiosa orientação e por me ensinar a importância de manter um bom relacionamento com as pessoas, o papel que um cientista deve assumir diante da sociedade e a ver com mais clareza meus objetivos. Era ele quem sempre estava lá para dar o equilíbrio, a motivação certa e a chamar minha atenção quando estava perdida em meio a ideias. Sem ele, não existiria tese.

Gostaria de agradecer, em especial também, ao Prof. Dr. Henrique Toma (LQSN-IQ-USP). Ele ficará para sempre em meu coração, pois foi ele quem me ensinou que eu poderia me apaixonar pela ciência e não precisava ter medo ou receio de expressar isso ao público. Ele me ensinou a ser eu mesma, a confiar na minha potencialidade e a seguir meus sonhos. Agradeço também por todo apoio financeiro e de infraestrutura do laboratório, e pelas infinitas conversas sobre artes, filosofias, sobre vida! Não poderia deixar de mencionar suas aulas, pois elas ficarão marcadas para sempre também.

Não poderia deixar de agradecer, em especial também, ao Dr. Sergio Toma (LQSN-IQ-USP). Sua contribuição para o desenvolvimento da minha tese foi imensurável. Me ensinou muita química e sempre mostrou-se prestativo, atencioso e paciente, respondia todas as minhas perguntas e questionamentos. Seu caráter é admirável também, principalmente sua humildade e mansidão, que serão exemplos para mim sempre.

Agradeço muito aos Professores Maria Julia e Ivan (LBP-Bioquímica) por todo ensinamento e pela paciência para comigo. O mundo da bioquímica, dos anticorpos e da microscopia foi revelado a mim através de vocês.

Agradeço muito também à Prof^a Dra. Sandra Farsky (FCF-USP) por estar sempre disposta a aceitar nossos desafios e a discutir ciência, por todo conhecimento transmitido e por abrir seu laboratório para a realização de tantos experimentos relacionados à toxicidade. Agradeço também seus alunos Dra. Carine, Ana, Dr. Stephen e Dra. Simone por todos os

experimentos feitos em colaboração, pelas discussões e aprendizados, que muito ajudaram na realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Said Rabbanni (IF-USP) e ao Dr. Hernán Joel por abrirem a porta do laboratório sem restrições, fui muito bem recebida e posso dizer que muitas vezes me senti em casa estando lá. Obrigada pelas ideias desenvolvidas, pelo aprendizado concomitante acerca dos cuidados com os animais e a importância da nanotecnologia no campo da ressonância magnética.

Agradeço às Prof^{as} Eliana e Irene (Instituto Butantan) por abrirem as portas de seu laboratório, por todo conhecimento transmitido, e pelo apoio e acompanhamento dos experimentos de digestão dos anticorpos com papaína e pepsina.

Agradeço ao Professor Dr. Pedro Kunihiro Kiyohara e a Dra. Simone Perche de Toledo (IF-USP) pelas imagens de MET, ao Professor Dr. Pedro Vitoriano e Dr. Maciel Luz (IQ-USP) pelas dosagem de ferro nas amostras através do GF-AAS e ao Professor Eduardo Colli (IME-USP) pelas ideias e discussões acerca das aproximações matemáticas no modelo dos bioconjugados de ouro.

Agradeço também ao Professor Etelvino Bechara (Unifesp), que tive o privilégio de conhecer sua casa e suas estimadas Laura (filha) e Marina (esposa). Obrigada por todas as conversas, todo cuidado, preocupação e valiosos conselhos que me deu. Nunca me esquecerei dessa família.

Não me esquecerei de todos os colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do grupo LQSN e LBP ao longo desses oito em que fiquei no laboratório. Sou muito grata pela companhia, pelas risadas e também pelas discussões científicas. Em especial, gostaria de agradecer ao Delmarcio Gomes, Roberta Mansini, Manuel Huila, André Parussulo e Tiago Matias (mais conhecido como Borra), amigos que sempre guardarei em meu coração, pessoas que fizeram diferença nessa longa caminhada.

Quero agradecer especialmente aos amigos do IQ: Cléia e Iguatinã, por todo carinho, apoio e amizade demonstrados. Eles foram essenciais, amigos mais chegados que um irmão, amigos para sempre! Sempre presentes, compartilhamos nossas alegrias e frustrações ao longo desses 5 anos. Não poderia deixar de mencionar meus amigos da graduação também: Paulo Toledo e Mariana Figueiredo, que foram muito mais do que simples colegas de sala ou de laboratório. Foram verdadeiros amigos, amigos de confiança, amigos que se importam, que sempre estão ali quando você precisa.

O que seria de mim sem os técnicos Alceu Totti, Ulisses Condomitti, Marcelo Nakamura, Célia Braga, Robertinho, Marinês e Maria Luiza Baldini? Não existe ciência sem eles. Serei eternamente grata por sempre se esforçarem em manter ordem diante de um cenário tão caótico que é um laboratório de pesquisa, por estarem absolutamente dispostos a ajudar e a dar um jeito de encaixar na agenda tão lotada deles um horário para nos ensinar ou fazer um experimento. Obrigada mesmo!

Gostaria de agradecer aos funcionários do Instituto de Química, em especial à Maria Aparecida Paiva Lopes, à Sônia Ribeiro e ao Ricardo Couto por sempre serem tão prestativos e solícitos.

Na vida, o bem mais precioso que um ser humano pode ter é a família. Nunca conseguirei agradecer à altura o que minhas irmãs Priscila e Marcella, mas especialmente meus pais, Leonice e Gilberto, fizeram por mim. Eles acreditaram desde o começo no meu potencial, sempre apoiaram as minhas escolhas e me animaram durante a caminhada, mesmo que eu mesma não acreditasse em mim ou não tivesse certeza dessas escolhas. Talvez, nem eles imaginavam que eu iria tão longe como fui, mas foram a força motriz para isso acontecer. Minha avó Nadir, tias Marisa, Marcia e Ana, e tios Levi e João, foram fundamentais também, pois, além de me apoiarem e torceram pelas minhas conquistas, oraram sem cessar pela minha proteção e sucesso. Serei eternamente grata pelo amor e dedicação de cada um deles.

Nunca conseguirei retribuir tudo o que o Felipe, mais conhecido como Fofó, fez por mim. Obrigada pelo amor, carinho, amizade, apoio, por acreditar em mim e pela paciência demonstrados ao longo dessa jornada. Ele foi meu equilíbrio nas minhas inconstâncias, minha alegria nas tristezas, minha paz nas tempestades, minha esperança nas perdas, minha certeza nas dúvidas e minha motivação nos desânimos. Foi a pessoa que mais acompanhou meu dia-a-dia de perto, o desenvolvimento da minha pesquisa e da minha tese, sempre preocupado para eu que atingisse meus objetivos. Agradeço muito a ele, pois foi uma das pessoas fundamentais para que eu conquistasse esse novo título. Obrigada por ter colaborado na escrita da minha Tese também.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, e, na impossibilidade de citá-las uma a uma, contribuíram com seu apoio para a realização deste trabalho.

Agradeço também à banca examinadora, por ter aceitado julgar este trabalho.

E finalmente, agradeço à FAPESP, pela bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro.

Senhor, tu me sondas e me conheces.
Sabes quando me sento e quando me levanto; de longe percebes os meus pensamentos.
Sabes muito bem quando trabalho e quando descanso; todos os meus caminhos te são bem conhecidos.
Antes mesmo que a palavra me chegue à língua, tu já a conheces inteiramente, Senhor.
Tu me cercas, por trás e pela frente, e pões a tua mão sobre mim.
Tal conhecimento é maravilhoso demais e está além do meu alcance, é tão elevado que não o posso atingir.
Para onde poderia eu escapar do teu Espírito? Para onde poderia fugir da tua presença?
Se eu subir aos céus, lá estás; se eu fizer a minha cama na sepultura, também lá estás.
Se eu subir com as asas da alvorada e morar na extremidade do mar,
mesmo ali a tua mão direita me guiará e me susterá.
Mesmo que eu dissesse que as trevas me encobrirão, e que a luz se tornará noite ao meu redor,
verei que nem as trevas são escuras para ti. A noite brilhará como o dia, pois para ti as trevas são luz.
Tu criaste o íntimo do meu ser e me teceste no ventre de minha mãe.
Eu te louvo porque me fizeste de modo especial e admirável. Tuas obras são maravilhosas! Disso tenho plena certeza.
Meus ossos não estavam escondidos de ti quando em secreto fui formado e entretecido como nas profundezas da terra.
Os teus olhos viram o meu embrião; todos os dias determinados para mim foram escritos no teu livro antes de qualquer deles existir.
Como são preciosos para mim os teus pensamentos, ó Deus! Como é grande a soma deles!
Se eu os contasse seriam mais do que os grãos de areia. Se terminasse de contá-los, eu ainda estaria contigo.

[Salmos 139:1-18](#)

RESUMO

Uchiyama, M. K. “**Estudo de nanopartículas de ouro e de magnetita voltadas para medicina diagnóstica**”. 2015. 222p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A teragnóstica de doenças tem sido extremamente marcada nos últimos anos por nanomateriais formados pela conjugação de nanopartículas a biomoléculas, pois a aplicação de tecnologias baseadas em materiais na dimensão nanométrica é capaz de aumentar a seletividade, sensibilidade e praticidade dos métodos atualmente empregados, ou mesmo criar novos métodos de diagnóstico e tratamento de doenças. Dentre os vários tipos de nanomateriais desenvolvidos, aqueles baseados em nanopartículas de ouro ou nanopartículas magnéticas apresentam propriedades químicas e físicas diferenciadas que propiciam novas possibilidades. Por exemplo, a presente tese demonstrou que nanopartículas superparamagnéticas são excelentes agentes de contraste em exames de imagem por ressonância magnética (IRM) por serem mais seguros, apresentarem melhor contraste nas imagens e possibilitarem direcionar/concentrar o material em tecidos ou tumores através de um gradiente de campo magnético aplicado. Foram feitos numerosos ensaios de toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* para assegurar a segurança da aplicação de nanopartículas no organismo, cujo potencial de uso somente se tornará uma realidade caso os nanomateriais se mostrem não tóxicos e biocompatíveis. Apesar dos significativos avanços na área da aplicação desses nanomateriais, não foram encontrados na literatura modelos capazes de explicar ou prever por quais sítios de ligação devem ocorrer as interações proteína-nanopartícula, como também não foram encontrados estudos sistemáticos acerca dos fatores que determinam a estabilidade e a funcionalidade dos nanobioconjugados (NBCs). Assim, nesta tese buscamos compreender os fatores responsáveis pela ligação/adsorção das proteínas nas nanopartículas de ouro e sua influência sobre a estabilidade das suspensões e a funcionalidade das proteínas. Desta forma, foram obtidos NBCs com propriedades adequadas para o desenvolvimento ou aprimoramento de ensaios de diagnóstico e até para o tratamento de doenças. Foi demonstrado o potencial das nanopartículas de ouro para melhorar a performance de imunoenaios do tipo ELISA, mas também podem ser utilizadas para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, explorando as propriedades plasmônicas das nanopartículas de ouro acopladas a técnicas como SERS, SPR e microscopia Raman confocal.

Palavras-chave: nanotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, teragnóstica, agente de contraste em IRM, propriedade anti-inflamatória, direcionamento magnético, biodistribuição

ABSTRACT

Uchiyama, M. K. “**Study of gold and magnetite nanoparticles for medical diagnostics applicatios**”. 2015. 222p. Ph.D Thesis – Graduate Program in Chemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

Theranostics has been intensively pursued in recent years using hybrid materials based on nanoparticles conjugated with biomolecules. This is an interesting strategy to increase the selectivity and sensitivity, as well as to improve the currently used methods facilitating their use or creating new ones. Among the various types of nanomaterials, those based on gold and magnetic nanoparticles exhibit interesting chemical and physical properties in the biological environment, differing from that of free drugs or current explored in assay methods. For example, superparamagnetic nanoparticles are excellent contrast agents for magnetic resonance image (MRI) diagnostics because they are safer, present a better contrast efficiency for imaging and can be magnetically accumulated in tissues or tumors using a magnetic field. Numerous *in vitro* and *in vivo* toxicity assays were performed to ensure the safety for medical applications. Clearly, these type of applications only will be realized if nanomaterials prove to be nontoxic and biocompatible. This imply an strict control on their structure and composition. However, despite the significant advances in the development of such nanomaterials, there were not found in the literature model systems explaining or that can be used to predict by which sites the protein-nanoparticle binding should take place. In addition, no systematic studies on the factors determining the stability and the functionality of nanobioconjugates (NBC) were found. Thus, this thesis is focused in unveiling the factors responsible for binding/adsorption of proteins on gold nanoparticles and their influence on the colloidal stability of hybrid nanoparticles suspensions while keeping the functionality of biomolecules. In fact, NBC with enhanced properties suitable for the development of diagnostic methods and even for treatment of diseases were obtained. These nanomaterials can improve the ELISA immunoassay, or other diagnosis methods can be developed by using the gold nanoparticles plasmonic properties in association with SERS, SPR and confocal Raman microscopy techniques.

Keywords: *in vitro* and *in vivo* nanotoxicity, theranostic, MRI contrast agent, anti-inflammatory property, magnetic targeting, biodistribution

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs	Nanopartículas de ouro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
CECUA	Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Cuidado e Experimentação Animal
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetraacético)
Fab	Porção do anticorpo que contém os dois sítios de reconhecimento aos antígenos, que pode ser obtido pela digestão do IgG com papaína
F(ab') ₂	Fragmento de anticorpo gerado pela digestão com pepsina
Fc	Porção do anticorpo que não contém os sítios de reconhecimento aos antígenos
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína - anexina)
H3.3	Antígeno descoberto e produzido pelo LBP-IQUSP que representa um trecho da Tc85 (proteína de membrana da forma tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i>)
IFI	Imunofluorescência indireta
i.p.	Administração intraperitoneal
i.v.	Administração intravenosa
IgG	Imunoglobulina do tipo G (anticorpo)
mIgG	Anticorpo monoclonal
pIgG	Anticorpo policlonal
MagNP	Nanopartícula Magnética

MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão (no inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i> , TEM)
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura (no inglês, <i>Scanning Electron Microscopy</i> , SEM)
IRM	Imagem por Ressonância Magnética (no inglês, <i>Magnetic Resonance Imaging</i> , <i>MRI</i>)
NBCs	Nanobioconjugados
NPs	Nanopartículas
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares de sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PEG	Polietilenoglicol
pH	<i>Potential Hydrogen</i> (Unidade de medida da atividade de íons H ⁺ em meio aquoso)
pI	Ponto isoelétrico
PI	<i>Propidium iodide</i> (Iodeto de propídeo)
PMC	<i>Polymorphonuclear cells</i> (células polimorfonucleares)
PSA	Prostate-Specific Antigen (antígeno de câncer de próstata)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio de cultura de células)
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i> (Espalhamento Raman intensificado por superfície)
SFB	Soro fetal bovino
SPIOs	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i> (Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro)
SPB	<i>Surface Plasmon Band</i> (Banda Plasmônica de Superfície)

SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Ressonância Plasmônica de Superfície)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (Fator de necrose de tumor)
Tris-HCl	Tampão tris(hidroximetil)aminometano acidificado com HCl (ácido clorídrico)
Ty	Tripomastigota da cepa Y infectante em seres humanos
USPIOs	<i>Ultrasmal Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i> (Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro ultrapequenas)
UV-Vis	Região espectral do ultra-violeta e do visível

SUMÁRIO

Apresentação da tese	21
Introdução Geral	23
Capítulo 1 - Nanopartículas de Ouro.....	28
1.1. OBJETIVOS	29
1.2. INTRODUÇÃO	30
1.2.1. A História do Ouro	30
1.2.2. Propriedades Químicas, Físicas e Biológicas das AuNPs	33
1.2.3. Nanobioconjugados: Conjugação de AuNPs a Biomoléculas.....	39
1.2.4. Toxicidade de Nanobioconjugados de Ouro.....	44
1.3. MATERIAL E MÉTODOS	48
1.3.1. Método de Turkevich	48
1.3.2. Nanobioconjugados	49
1.3.2.1. Produção e Purificação de Anticorpos Monoclonais.....	50
1.3.2.2. Produção, Deslipidação e Purificação de Anticorpos Policlonais	51
1.3.2.3. Produção e Purificação das Porções Fab e F(ab)' ₂	54
1.3.3. Estudo de Estabilidade dos Nanobioconjugados	56
1.3.4. Toxicidade Hematológica e Microvascular <i>In vivo</i> e <i>In vitro</i> de AuNP e de Seus Bioconjugados	57
1.3.5. ELISA de Nanobioconjugados	67
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
1.4.1. Nanopartículas de Ouro.....	70
1.4.1.1. Distribuição do Tamanho por Número e Intensidade.....	71
1.4.1.2. Modificações no Método do Citrato	73
1.4.1.3. Variação da Concentração de Citrato de Sódio	76
1.4.1.4. Cálculo da Concentração de AuNPs	79
1.4.2. Nanobioconjugados	83

1.4.2.1. Caracterização dos Bioconjugados de Ouro	83
1.4.2.2. Anticorpos Monoclonais.....	95
1.4.2.3. Anticorpos Policlonais.....	97
1.4.2.4. Porções Fab e F(ab') ₂	101
1.4.2.5. Número de Proteínas por Nanopartícula	108
1.4.3. Estudo de Estabilidade Coloidal dos Nanobioconjugados	112
1.4.4. Toxicidade Hematológica e Microvascular <i>In vivo</i> e <i>In vitro</i> de AuNP e de Seus Bioconjugados	118
1.4.5. ELISA de Nanobioconjugados	135
1.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	142
 Capítulo 2 - Nanopartículas Superparamagnéticas	 144
2.1. OBJETIVOS	145
2.2. INTRODUÇÃO	146
2.2.1. A História das Nanopartículas Magnéticas	146
2.2.2. Propriedades Químicas, Físicas e Biológicas das USPIOs	147
2.2.3. Toxicidade de Nanomateriais Magnéticos de Óxido de Ferro	153
 2.3. MATERIAL E MÉTODOS	 157
2.3.1. Síntese das Nanopartículas Superparamagnéticas	157
2.3.2. Imagem por Ressonância Magnética e USPIOs	159
2.3.2.1. USPIOs como Agentes de Contraste em IRM	161
2.3.2.2. Magneto-direcionamento de USPIOs	162
2.3.3. Estudo da Toxicidade <i>In Vivo</i> das USPIOs	163
 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 172
2.4.1. Caracterização das Nanopartículas Superparamagnéticas	172
2.4.2. Imagem por Ressonância Magnética e USPIOs	183
2.4.2.1. USPIOs como Agentes de Contraste em IRM	183
2.4.2.2. Magneto-direcionamento de USPIOs	188
2.4.3. Estudo da Toxicidade <i>In Vivo</i> das USPIOs	192
 2.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	 199

Capítulo 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	200
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	203
APÊNDICE 1	210
APÊNDICE 2	217
APÊNDICE 3.....	220

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado divide-se em quatro seções, tendo por base a exploração das propriedades químicas e físicas das nanopartículas de ouro e nanopartículas magnéticas, conjugadas ou não a biomoléculas, objetivando aprimorar métodos de diagnóstico de doenças atualmente empregados.

A introdução geral descreve o cenário atual da nanotecnologia no campo da medicina, de modo a explicitar a importância da temática de estudo escolhido.

O capítulo 1 abarca toda a pesquisa desenvolvida com as nanopartículas de ouro (AuNPs) ao longo desses cinco anos, enquanto que o capítulo 2 abrange o estudo das nanopartículas magnéticas. Cada um desses capítulos conta com uma introdução específica, materiais e métodos utilizados, resultados e discussão, além de uma conclusão parcial referente aos respectivos resultados. Com tal organização, procurou-se discernir as propriedades e aplicações específicas que essas partículas apresentam, facilitando a leitura e a compreensão do texto.

O capítulo 1 destaca a importância da AuNP como plataforma para desenvolver nanomateriais que possibilita aprimorar os processos de investigação de doenças, superando as limitações e dificuldades atuais no diagnóstico de doenças. Essas nanopartículas possuem características extremamente úteis, como, por exemplo, as suas propriedades ópticas únicas, as quais podem ser aproveitadas na área de biosensores. Ademais, a facilidade de conjugação de biomoléculas em AuNPs permite aumentar a seletividade e direcionar os nanobioconjugados para regiões de interesse diagnóstico, preservando o alto grau de biocompatibilidade. Além disso, no capítulo 1 são abordados a tradicional síntese de AuNPs pelo método do citrato e o processo de modificação de sua superfície com diferentes biomoléculas, e mostrados os resultados das investigações sobre a ligação biomolécula-

nanopartícula e os fatores que influenciam a estabilidade coloidal desses nanobioconjugados. A baixa toxicidade desses materiais, quando administrados intravenosamente em ratos ou incubados com células humanas, foi confirmada. Estudos também foram realizados para confirmar e entender o processo anti-inflamatório desencadeado pelas AuNPs.

As propriedades das nanopartículas magnéticas e sua aplicação em diferentes áreas de pesquisa e desenvolvimento são abordadas no capítulo 2. Foi explorada a sua capacidade de atuar como agente de contraste em exames de imagem por ressonância magnética (IRM) em comparação com outros compostos atualmente utilizados. Aplicando um gradiente de campo magnético pode-se concentrar magneticamente essas nanopartículas em uma determinada região do organismo, após sua administração intravenosa, evidenciando a sua aplicabilidade na área de entrega direcionada de fármacos para teragnóstica de doenças como o câncer. Ensaio de toxicidade também foram realizados para confirmar a segurança desses materiais quando administrados intravenosamente em ratos.

No capítulo 3 são apresentadas as considerações finais dos estudos em questão, oferecendo uma conclusão geral baseada nos resultados e propostas de aplicação demonstradas ao longo dos dois capítulos anteriores, de forma a evidenciar o potencial e a aplicabilidade daqueles nanomateriais para a teragnóstica de doenças, devido as suas propriedades únicas e não-convencionais.

INTRODUÇÃO GERAL

A nanotecnologia é, atualmente, uma das mais novas áreas na fronteira do conhecimento científico-tecnológico. Ela se baseia no controle da matéria na escala nanométrica (bilionésima parte do metro), podendo levar ao desenvolvimento de novos materiais com características melhoradas ou revolucionárias e, conseqüentemente, a novos produtos e processos.

De acordo com Robert A. Freiras Jr [2], idealmente a nanomedicina pode ser definida como o monitoramento, reparação, construção e controle de sistemas biológicos humanos a nível molecular, utilizando nanodispositivos e nanoestruturas engenheiradas. Hoje já existem materiais nanoestruturados mais simples, multifuncionais, híbridos [3] ou bioconjugados, que estão sendo e serão extremamente úteis em aplicações médicas. Mas devido às suas limitações, as possíveis aplicações devem se esgotar a curto e médio prazo. Por isso, é vital que a pesquisa nesta área continue com força para que, quem sabe um dia, nanomáquinas e nanorrobôs precisamente controlados ou programáveis sejam desenvolvidos ao nível descrito acima.

No dia em que robôs em nano-microescala, programáveis, controláveis e seguros, compostos por peças fabricadas em escala com precisão sub- e nanométrica forem produzidos em quantidade, permitirá aos médicos executar procedimentos para tratamento de doenças ou até a reconstrução do corpo humano nos níveis celular e molecular. A capacidade de controlar eventos diretamente no nível celular é a chave para desbloquear o prolongamento indefinido da saúde humana e expandir as capacidades humanas, mas até lá o homem terá que aprender a manipular a matéria em nível nanométrico de forma precisa e controlada. Essa temática serviu como motivação para o desenvolvimento da presente tese e acredito que esta contribuiu para ratificar e enaltecer a importância de nanobiomateriais na área médica.

Tais máquinas microscópicas foram idealizadas primeiramente pelo físico Richard Feynman, em 1959, e, posteriormente, foram descritas em pormenor por K. Eric Drexler em seus livros populares *Engines of Creation* (1986) e *Unbounding the Future* (1991), e em seu livro técnico mais recente *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation* (1992). Atualmente, a projeção e construção destes dispositivos (ou seus componentes mais importantes) estão sendo ativamente apoiadas pelo Instituto de Manufatura Molecular, Laboratório de Robótica Molecular da Universidade do Sul da Califórnia, Centro de Nanociência e Nanotecnologia da Universidade de Rice, *NAS Molecular Computacional Nanotechnology Group* da *NASA/Ames Research Center*, e por muitas outras organizações universitárias e governamentais nos Estados Unidos, Europa e Japão, e também no setor privado por empresas de nanotecnologia de capital aberto tais como a *Zyvex* e a *Molecular Manufacturing Enterprises Inc. (MMEI)*.

Mas por que nanomateriais? Quais as vantagens em se trabalhar nesta dimensão? Para começar, o regime da física nesta dimensão se encontra entre o eletromagnético clássico e o quântico, por isso as propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais quando reduzidos a esta escala são diferentes de quando são macroscópicos (*bulk*). Por exemplo, o ouro é conhecido por ser dourado, mas quando este é fragmentado até as dimensões nanométricas, sua coloração pode variar em função do tamanho, de modo que nanopartículas de 20, 35 e 50 nm são, respectivamente, vermelho, roxo e azul. Esse fenômeno é decorrente da ressonância plasmônica localizada associada à oscilação dos elétrons livres (característicos nos metais) causada pelo campo elétrico oscilante da luz incidente. Essas mudanças de propriedades dos materiais não se situam somente no campo da óptica, mas praticamente em todas as características medidas e classificadas de materiais como condutividade elétrica e térmica, maleabilidade, resistência mecânica, reatividade química, etc. Por isso, nesta tese foram exploradas as propriedades que o ouro e a magnetita apresentam, quando encontram-se

nesta escala de tamanho, para tentar melhorar metodologias convencionais de diagnóstico de doenças como ELISA e IRM.

Um fator muito importante é a relação área/volume das nanopartículas, pois ao reduzir o tamanho, essa relação aumenta muito. Para entender isso, suponha um bloco de ouro maciço de determinada massa. Este bloco apresenta uma determinada área superficial inicial, mas ao fracioná-lo ao meio, a área total aumenta com o surgimento de mais duas faces que antes não existiam. Assim, pode-se inferir que ao se repetir este fracionamento inúmeras vezes, a área superficial total se tornará muito elevada quando a massa inicial for dividida em fragmentos muito pequenos. Como consequência dessa elevada área superficial, este material apresenta alta reatividade, o que é fundamental, por exemplo, na área de nanocatalisadores. Por outro lado, a energia deste sistema passa a ser elevada, por isso nanomateriais tendem a se fundir ou a se agregar com o tempo como forma de minimizar a energia do sistema, e, por isso, são considerados meta-estáveis. Para contornar este problema, a superfície dessas partículas diminutas deve ser modificada quimicamente com moléculas que irão causar repulsão eletrostática ou impedimento estérico entre as partículas. Nesta tese, foram exploradas diversas moléculas e biomoléculas como agentes estabilizantes das nanopartículas de ouro através de estudos de estabilidade coloidal em diferentes meios.

Interessantemente, a vida é controlada por processos moleculares que envolvem estruturas nanométricas como proteínas, material genético, membranas e organelas celulares. Assim, pelo fato dos nanomateriais apresentarem a mesma dimensão, causam um impacto ou efeito diferenciado no meio biológico. Por causa disso, um cuidado extra deve ser tomado quando esses materiais são administrados no organismo. Na literatura há milhares de artigos que mostram os efeitos tóxicos que esses nanomateriais podem ou não causar em diferentes sistemas ou modelos biológicos. Entretanto, a variedade de materiais nanométricos já produzidos também beira aos milhares, e só o fato de alterar-se o tamanho, a forma, a carga

superficial ou a molécula presente na superfície, pode acarretar uma mudança drástica inesperada na toxicidade. Existem relatos de que nanopartículas menores que 10 nm podem cruzar a barreira hemato-medular e hemato-encefálica, o que não é desejado se o tratamento não visar essas regiões. Portanto, é fundamental estudar exaustivamente os efeitos que esses materiais podem causar tentando cobrir o máximo possível de variáveis. Nas introduções dos capítulos 1 e 2, há um maior detalhamento desta questão de nanotoxicidade e ao longo da tese, estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas de ouro conjugadas a biomoléculas e das nanopartículas superparamagnéticas ultrapequenas e catiônicas são apresentados.

Nanopartículas de ouro e magnéticas foram escolhidas para desenvolver ou melhorar métodos de diagnóstico de doenças por serem nanopartículas mais estáveis, cuja modificação química da superfície com biomoléculas ou outras moléculas é factível, serem menos tóxicas e mais biocompatíveis, além de apresentarem características interessantes que podem ser exploradas para a teragnóstica de doenças. Nanopartículas de ouro podem ser usadas como agente de contraste em tomografia computadorizada de raio-X, enquanto que nanopartículas de magnetita podem ser usadas como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética. As suspensões das nanopartículas de ouro apresentam coloração que depende do tamanho das nanopartículas (ressonância plasmônica). Além disso, a coloração de uma determinada suspensão pode ser variada induzindo-se a aproximação de duas ou mais nanopartículas (acoplamento plasmônico), o que pode ser usado em métodos colorimétricos ou em biossensores para detecção de antígenos de uma dada doença. As nanopartículas magnéticas propiciam uma grande praticidade laboratorial (manuseio) e podem ser usadas para separar e concentrar biomoléculas ou células. Ambas podem ser modificadas com anticorpos ou outras moléculas direcionadoras e de reconhecimento, além de drogas para fazer *drug targeted-delivery*. Enfim, tanto as nanopartículas de ouro quanto as magnéticas têm

mostrado grande potencial como plataformas para aplicações médicas, principalmente na teragnóstica, como reafirmado e evidenciado ao longo de toda a tese através dos estudos realizados.

A presente tese explora essas características diferenciadas tanto das nanopartículas de ouro quanto das magnéticas para desenvolver novos nanobioconjugados com biomoléculas, visando melhorar ou criar métodos de diagnóstico de doenças.

CAPÍTULO 1

NANOPARTÍCULAS DE OURO

1.1. OBJETIVOS

Este primeiro foco em nanopartículas de ouro visou compreender e estudar a síntese, as propriedades e a estabilidade das nanopartículas de ouro conjugadas ou não a biomoléculas, objetivando a sistematização desses processos de síntese e de modificação para alcançar uma boa reprodutibilidade, assim possibilitando a sua aplicação no desenvolvimento de novos ou melhorados métodos de diagnóstico de doenças, como a doença de Chagas. Para tanto, testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* também foram realizados para confirmar a biocompatibilidade desses nanobioconjugados.

1.2. INTRODUÇÃO

1.2.1. A História do Ouro

O ouro é um dos temas de investigação científica mais antigos que existe, mas recentemente ganhou interesse renovado devido a sua atuação nas emergentes áreas da nanociência e da nanotecnologia, principalmente no que concerne ao desenvolvimento de nanopartículas. Nanopartículas de ouro (AuNPs), também chamadas de ouro coloidal, são partículas de dimensão na escala nanométrica e, dentre as nanopartículas metálicas, são as mais estáveis [4].

Para elucidar a importância do ouro e suas nanopartículas ao longo dos séculos, segue abaixo um rápido relato de histórias que foram traduzidas e adaptadas a partir de um excerto do artigo de revisão de Marie-Christine Daniel e Didier Astruc [4]:

“A extração do ouro iniciou-se no 5º milênio a.C. próximo a Varna (Bulgária), chegando a atingir 10 toneladas por ano no Egito por volta dos séculos 12 e 13 a.C., quando a estátua de Touthankamon foi construída com amplo uso do material. Já o ouro “solúvel”, o mesmo teria aparecido somente por volta dos séculos 4 e 5 a.C., no Egito e na China. Na antiguidade, o ouro era utilizado com propósitos estéticos e para tratamento de doenças, e suas nanopartículas foram usadas para a fabricação de vidros vermelhos. O exemplo mais famoso é o Copo de Licurgo, concebido entre o séculos 4 e 5 a.C., o qual mostra-se na cor vermelha em luz transmitida (posta no interior do copo) e verde em luz refletida (posta do lado externo a este), devido à presença de nanopartículas de ouro e de prata, como mostrado na **Figura 1**.

Figura 1: *Fotografias [5] do copo de Licurgo, onde vemos a coloração avermelhada (esquerda) com luz transmitida e esverdeada (direita) com luz refletida.*

A elevada estima pelo ouro solúvel até a Idade Média decorreu do poder de “cura” de várias doenças a ele atribuído, como problemas cardíacos e venéreos, disenteria, epilepsia e tumores, como também para o diagnóstico de sífilis. Tal serventia apresenta-se bem detalhada no que é considerado o primeiro livro sobre ouro coloidal, publicado pelo filósofo e médico Francisci Antonii em 1618, obra na qual foram coletadas informações sobre a produção de suspensões de ouro coloidal e suas utilidades médicas, incluindo casos práticos de sucesso.

Em 1676, um livro do químico alemão Johann Kunckels abordou o "ouro líquido, constituído por ouro metálico neutro, de coloração ligeiramente rosada, que trata várias doenças". Ele concluiu, bem antes de Michael Faraday, que "o ouro deve estar presente em tal forma que não é visível para o olho humano". Nessa época, século XVII, era popular a utilização do corante "Purple de Cassius" em vidros, que consiste em um coloide resultante da heterocoagulação de partículas de ouro e de dióxido de estanho.

Um tratado completo sobre ouro coloidal foi publicado em 1718 pelo filósofo e médico Hans Heinrich Helcher que afirmou "a utilização de amido cozido na preparação de ouro coloidal líquido reforçava visivelmente a sua estabilidade". Essas ideias eram comuns no século 18, como indicado num dicionário Francês datado de 1769, onde se lia "ouro potável:

ouro bebível constituído por ouro em sua forma elementar, mas sob extremas subdivisões de suspensão em líquido".

Em 1818, Jeremias Benjamin Richters sugeriu uma explicação para as diferenças na cor obtida em várias preparações de ouro potável: soluções cor de rosa ou roxo contêm ouro no melhor grau de subdivisão, enquanto que soluções amarelas são encontradas quando há muitas partículas agregadas.

Faraday relatou, em um trabalho bem conhecido de 1857, a formação de soluções de ouro coloidal de coloração vermelho intenso, pela redução do íon $[\text{AuCl}_4]^-$ em solução aquosa usando fósforo em um sistema de duas fases. Ele investigou as propriedades ópticas de filmes finos preparados a partir da secagem de soluções coloidais, e observou as alterações reversíveis da cor dos filmes pela compressão mecânica (de roxo-azulada para verde, sob pressurização).

O principal uso do ouro coloidal em medicina na Idade Média talvez tenha sido para o diagnóstico de sífilis, e muito embora o teste não seja completamente confiável, o método permaneceu em uso até o século 20.

No século 20, vários métodos para a preparação de coloides de ouro foram relatados e revisados. Nas últimas décadas, os coloides de ouro têm sido objeto de um número considerável de publicações, especialmente após os avanços relatado por Schmid e Brust [6]. O assunto vem sendo intensamente investigado, devido a aspectos fundamentais e aplicados, com atenção para o efeito quântico de tamanho, onde a maioria das referências foram geradas no século 21."

Além disso, muitas aplicações em diagnóstico têm sido desenvolvidas através de bioensaios e ensaios colorimétricos visando a quantificação de proteínas e polinucleotídeos. Por exemplo, Mirkin e colaboradores [7-9] desenvolveram métodos de quantificação de diferentes biomoléculas como o antígeno PSA e polinucleotídeos. O antígeno PSA é um

marcador de câncer de próstata e foi dosado através de um imunoenensaio baseado na precipitação magnética de dois nanobioconjugados, AuNP-IgG-DNA e MagNP-IgG, chegando ao limite de detecção de 330 fg/mL. Já os polinucleotídeos foram detectados colorimetricamente de forma seletiva através da mudança de coloração do vermelho para o roxo resultante do princípio de acoplamento plasmônico gerado pela aproximação de duas ou mais AuNPs. Isso foi possível através do ancoramento de uma simples fita do polinucleotídeo na superfície de uma AuNP, que ao se ligar à fita complementar conjugada a outra AuNP, promoveu a aproximação das mesmas, induzindo a mudança de coloração. Metodologia análoga foi proposta por Zhao [10] para a contagem/quantificação de bactérias.

1.2.2. Propriedades Químicas, Físicas e Biológicas das AuNPs

Nanopartículas de ouro têm recebido especial atenção em virtude de suas propriedades fascinantes [4, 11] como sua auto-organização em múltiplas estruturas, baixa toxicidade, biocompatibilidade [12, 13], estabilidade, propriedades ópticas únicas [1, 14] como a dependência tamanho-cor (efeito quântico de tamanho) mostrada na **Figura 2** e a facilidade de conjugação com biomoléculas [15]. Seu sucesso como bloco de construção de nanomateriais neste século é fruto de um trabalho de engenharia molecular, que depende da orientação e da organização das espécies moleculares ancoradas na superfície. Assim, pode-se obter partículas muito estáveis em diversos meios, podendo-se trabalhar em diversas faixas de pH e de força iônica.

Variando-se o tamanho (5-100 nm), o formato (esfera, bastão, cilindro, triângulo, estrela) e a constituição (ouro, prata e cobre) de uma nanopartícula, pode-se obter suspensões coloidais de colorações que cobrem quase todo o espectro ultravioleta-visível como evidenciado pela **Figura 2**. Essa propriedade é decorrente dos plasmons localizados de superfície que existem em materiais de dimensões nanométricas e constituídos por um dos

metais nobres acima citados. Mais detalhes e explicações sobre este tema encontram-se na próxima subseção intitulada “Ressonância Plasmônica de Superfície”. O que também é interessante, é o fato da coloração da suspensão de um desses materiais mudar de cor em função do grau de aproximação das partículas. Isso acontece devido ao fenômeno de acoplamento entre os plasmons dessas partículas e pode ser explorado para gerar nanosensores colorimétricos para, por exemplo, diagnosticar doenças.

Esses plasmons também aumentam a intensidade do espalhamento Raman de moléculas próximas ou ligadas à superfície das nanopartículas em até seis ordens de grandeza, fenômeno conhecido como Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS), o que também tem sido explorado para o desenvolvimento de sensores.

Na catálise, essas nanopartículas tem sido exploradas não somente pelo fato de apresentarem grande área superficial, mas por que esses plasmons também convertem a energia eletromagnética (luz) em calor. A fotoexcitação de nanopartículas de ouro em sua transição plasmônica em torno de 530 nm fornece as condições para realizar reações de alta energia em temperatura ambiente. Fasciani e colaboradores [16] concluíram, a partir da reação de alta energia de peróxido de cumilo, que este foi exposto a temperaturas de 500 °C durante submicrosegundos quando próximo à superfície das nanopartículas de ouro. E a grande vantagem é que esse calor não segue o fenômeno de irradiação padrão clássico, mas sua intensidade decai com a sexta potência da distância. Essa aplicação é interessante no meio biológico, pois pode ser usado para matar um tumor, por exemplo, por hipertermia, cujo calor produzido somente atinge a célula diretamente ligada à nanopartícula, diminuindo o efeito colateral causado pela morte de células sadias.

Figura 2: Micrografias eletrônicas de transmissão de nanoesferas e nanocilindros de Au (a,b) preparados pelo método do citrato/DMF; e fotografias de dispersões de nanopartículas da liga AuAg em função do aumento da concentração de Au (c), nanocilindros de Au em função do aumento do raio (d). Adaptado de [1].

No passado, as propriedades anti-inflamatórias de sais de ouro eram conhecidas e utilizadas no tratamento de doenças tais como a artrite reumatoide, psoríase e gota. Embora eficaz, esses tratamentos foram descontinuados por causa de vários efeitos adversos que causavam, principalmente pelo longo tempo necessário para o tratamento [17]. Neste contexto, têm sido propostas novas formulações de sais e íons de ouro por outros pesquisadores [18]. Mas na presente tese existem dados que indicam que as AuNPs são excelentes agente anti-inflamatórios, o que pode levar a novas possibilidades no tratamento de doenças inflamatórias, especialmente pela conjugação de AuNPs com outras drogas.

Ressonância Plasmônica de Superfície

Um espectro de extinção no UV-Visível típico de nanopartículas de cerca de 20-30 nm apresenta uma banda larga e intensa com máxima absorção por volta de 520 nm, como mostrado na **Figura 3**. Esta é atribuída à banda plasmônica de superfície localizada (*localized surface plasmon band*, SPB), que tende praticamente a zero em 800 nm. Mas a alta “absorbância” nas regiões de maior energia (abaixo de 450 nm) é devido ao espalhamento de

luz causado por toda e qualquer nanopartícula, que pode ser descrito por um decaimento exponencial conforme descrito por Rayleigh. No caso das AuNPs, esse espalhamento também contribui na região da banda plasmônica [19]. Assim, tipicamente, a expressão “coeficiente de extinção” tem sido utilizada na literatura em substituição à “absorção/absorbância”, por isso adotou-se a mesma nomenclatura na presente tese. Além do mais, a “absorção” de luz neste caso, não segue a teoria de orbitais moleculares que explica a excitação dos elétrons para níveis de energia mais elevados quando da interação com a radiação eletromagnética incidente quantizada.

Figura 3: Espectro de extinção UV-Visível típico de uma suspensão aquosa de nanopartículas de ouro sintetizada pelo método do citrato (cit-AuNP, linha cheia) e mesma suspensão após adição de cisteína (AuNP-cisteína, linha pontilhada).

A coloração vermelha-intensa das suspensões de AuNPs é causada pela absorção na região espectral do verde, por volta de 520 nm, devido à ressonância plasmônica de superfície (SPR). Essa banda (SPB) surge devido às oscilações coletivas de elétrons na superfície das nanopartículas, também conhecidos como plasmons localizados, induzidos pelo campo eletromagnético da luz incidente. Um plasmon pode ser entendido como uma onda associada à oscilação coletiva de cargas em um dado meio; no caso dos metais à oscilação dos elétrons livres de superfície. O estudo da SPB é relevante tanto do ponto de vista científico quanto

tecnológico, pois possibilitou uma melhor compreensão da estrutura de bandas em metais e das propriedades ópticas-espectroscópicas das NPs.

A natureza da SPB foi racionalizada a partir da publicação de Gustav Mie em 1908 [20]. A ressonância denotada como plasmons de superfície foi descrita a partir da resolução das equações de Maxwell para partículas esféricas diminutas, utilizando condições de contorno adequadas e supondo que o raio R dessas partículas esféricas seja muito menor do que o comprimento de onda da luz incidente ($2R \ll \lambda$). Esta condição é essencial para que o campo elétrico da luz possa ser considerado constante e homogêneo (modelo quasi-estático) e, assim, as interações sejam puramente eletrostáticas.

Nanopartículas ou *clusters* são definidos como partículas compostas de 3 a 10^7 átomos. Devido ao seu tamanho, elas apresentam propriedades que não são nem as de moléculas, nem as do material macroscópico. A SPB é observada nos espectros de extinção de NPs metálicas maiores do que 2 nm, pois abaixo desse tamanho os efeitos quânticos são predominantes e a SPB não é mais observada. Todos os metais possuem esta propriedade, no entanto, a série Au-Ag-Cu apresenta SPBs muito intensas no ultravioleta próximo e no visível. Esse fator associado à facilidade de síntese e à robustez explicam o sucesso das NPs de ouro e prata. A posição, a forma e a intensidade da SPB depende fortemente de vários fatores: a constante dielétrica do meio, que depende das interações com o meio circundante como o solvente; as interações eletrônicas entre as moléculas protetoras e a nanopartícula, que alteram a densidade eletrônica das nanopartículas; e o tamanho, forma e o grau de dispersão das NPs [21].

Na formação do plasmon localizado, ocorre a excitação coletiva dos elétrons livres de partículas em ressonância com o momento de dipolo oscilante da luz, gerando uma separação dipolar de cargas momentânea, conforme ilustrado na **Figura 4**, e estados excitados de energia imediatamente acima do nível de Fermi. Em consequência, as cargas contrárias

geradas em lados opostos da partícula produzem uma força restauradora, de origem eletrostática, que guarda relação com a frequência de ressonância e com o tamanho das partículas. Esses processos de excitação e restauração dão origem a uma onda plasmônica. Por essa razão observam-se mudanças de cor quando se altera o tamanho das partículas. O impacto da teoria de Mie foi tão importante na área, que a maioria dos trabalhos subsequentes a esse explicam o comportamento espectroscópico de AuNPs baseado em sua teoria.

Figura 4: Esquema da interação da radiação eletromagnética com nanopartículas metálicas. Um dipolo elétrico é induzido, o qual oscila em fase (ressonância) com o campo elétrico da luz incidente. Adaptado de [1].

Entretanto, sabe-se que quando partículas metálicas se apresentam desprovidas de uma camada de passivação eficiente (no caso, citrato), capaz de estabilizar eletrostaticamente ou estericamente a suspensão coloidal, o fenômeno de aglomeração e mesmo de fusão das nanopartículas é observado, gerando nanopartículas maiores. No momento em que duas ou mais nanopartículas se aproximam sem sofrer fusão, a uma distância menor que cerca de 2 vezes o seu diâmetro, ocorre o acoplamento dos campos elétricos oscilantes dos plasmons localizados. Isso leva ao aparecimento de estados de menor energia e à mudança de coloração da suspensão do vermelho para roxo/azulado, como mostrado na **Figura 3** com a adição de cisteína. Essa agregação pode ser induzida com o aumento da força iônica do meio ou através da adição de algum ligante-ponte, como é o caso da cisteína, que se liga de um lado com uma nanopartícula e do outro com uma outra. A cisteína é um aminoácido, por isso apresenta os grupos amino e carboxilato, além do resíduo que contém um grupo tiol, e atua como uma

ponte entre duas nanopartículas devido à afinidade desses grupos químicos com o ouro. Assim, esse tipo de efeito está sendo utilizado para gerar imunossensores através da interação antígeno-anticorpo ou de quaisquer espécies com interações específicas ou pelo menos seletivas.

Deve-se tomar um cuidado especial para controlar o tamanho e a forma das nanopartículas durante a síntese. Assim, fazendo-se um ajuste fino do processo de nucleação e crescimento das partículas, pode-se preparar materiais altamente monodispersos e com formato uniforme. Desta forma, é importante adicionar todo agente redutor (no caso, citrato) quase instantaneamente, sob forte agitação e próximo à temperatura de ebulição (maior que 95 °C) para garantir que os processos redox, de nucleação e de crescimento das partículas ocorra homogeneamente em toda a solução.

Suspensões de nanopartículas monodispersas, ou seja, de tamanhos muito similares, podem ser obtidas controlando-se o processo de nucleação. Idealmente, um grande número de núcleos estáveis devem ser simultaneamente formados para que o crescimento subsequente por transporte de massa possa ocorrer independentemente da etapa de nucleação. Além disso, é imprescindível o uso de estabilizantes para evitar o crescimento desordenado por meio dos processos de fusão causados pelas colisões entre as nanopartículas.

1.2.3. Nanobioconjugados: Conjugação de AuNPs a Biomoléculas

Nos últimos 20 anos, o campo de diagnóstico molecular foi marcado por um expressivo interesse em **nanobioconjugados** [22-26], materiais de tamanho nanométrico constituídos pela associação de **nanopartículas** (metálicas, lipídicas, poliméricas, dentre outras) a **biomoléculas** como proteínas (anticorpos, antígenos e enzimas), lipídeos e ácidos nucleicos, conforme hipoteticamente ilustrado na **Figura 5**. Essa intensa pesquisa visa

desenvolver novas tecnologias capazes de suprir as limitações existentes nas tecnologias convencionais, aumentando sua seletividade, sensibilidade e praticidade, além de propiciar uma eventual diminuição de custo. Por exemplo, a utilização de nanopartículas superparamagnéticas aumenta significativamente o contraste e a sensibilidade da técnica de imagem por Ressonância Magnética (IRM) possibilitando a detecção de tumores em estágios mais precoces e, conseqüentemente, melhorando o prognóstico da doença e até mesmo aumentando a probabilidade de cura. Esforços também estão sendo realizados para melhorar a sensibilidade (diminuição da janela imunológica) do método ELISA, utilizado no diagnóstico de numerosas doenças.

Nanobioconjugados de ouro (NBCs) também têm sido explorados [15] em aplicações terapêuticas em virtude da facilidade de conjugação de anticorpos e outras biomoléculas à superfície de AuNPs, por possuírem secções de choque cerca de 4 a 5 ordens de grandeza maiores que as dos corantes convencionais, e por serem muito estáveis fotoquimicamente.

As possibilidades de aplicação dos NBCs são abrangentes, e vão desde imunossensores ultrasensíveis a veículos projetados para entrega direcionada de fármacos ou biomoléculas (*drug targeted delivery*) para diagnóstico e tratamento de doenças. Por exemplo, presentemente está sendo desenvolvido um novo método de diagnóstico e tratamento de células tumorais utilizando o princípio de *targeted delivery* de um NBC. Este é constituído de nanopartículas de ouro ligadas a um anticorpo específico que reconhece uma proteína integrante da membrana da célula tumoral. Por isso se liga especificamente a essas células possibilitando uma clara visualização de sua estrutura por imagem por ressonância magnética nuclear (IRM) e o tratamento [27, 28] por hipertermia, alcançando até mesmo tecidos mais internos. O aquecimento, e a conseqüente morte celular, é provocado pela incidência de ondas eletromagnéticas na faixa do infravermelho próximo, valendo-se de uma propriedade

intrínseca das AuNPs, ou seja, a presença de uma intensa banda de absorção de ressonância plasmônica [21, 29] de superfície naquela região espectral.

Figura 5: Ilustração esquemática de um nanobioconjugado formado pela ligação de biomoléculas como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e açúcares em nanopartículas de ouro (esfera amarela). Reproduzido de [4].

Figura 6: Formação de nanopartícula de ouro conjugada a biomoléculas utilizando-se diferentes métodos como por interações eletrostáticas (A) ou por ligação coordenativa entre o ouro e grupos funcionais: (B) tiol, (C) amina e (D) base N-heterocíclicas, presentes na superfície das biomoléculas. (E) Representação da ligação antígeno-anticorpo com o anticorpo preso à superfície da AuNP.

O processo de funcionalização com biomoléculas é uma das etapas mais importantes e pode ser realizado utilizando-se interações eletrostáticas (**Figura 6A**) ou ligações covalentes coordenativas (**Figura 6B-D**). No caso de nanopartículas de ouro, a ancoragem das biomoléculas pode ser realizada particularmente por meio de grupos tiol, como mostrado na **Figura 6B**, mas também por meio de aminas (**Figura 6C**) e bases N-heterocíclicas (**Figura 6D**) presentes na superfície das biomoléculas. Caso a funcionalização seja adequada, a atividade das biomoléculas será preservada de modo que podem participar de reações de hibridização ou reconhecimento molecular característico, por exemplo, do tipo antígeno-anticorpo, como mostrado na **Figura 6E**. Assim, as proteínas podem ser utilizadas para direcionar aqueles nanomateriais para um alvo específico ou ligar seletivamente biomoléculas em sua superfície. Outras funcionalidades, além da especificidade e seletividade, podem ser incorporadas àqueles nanomateriais, ligando moléculas ou biomoléculas que, por exemplo, ativem o mecanismo de fagocitose das células alvo possibilitando a liberação de fármacos em seu interior.

Proteínas (IgG, por exemplo) podem se ligar espontaneamente [14] à superfície de nanopartículas de ouro. Todavia, essa ancoragem é definida pela competição entre os diversos sítios de ligação presentes na sua superfície, e depende das propriedades termodinâmicas e cinéticas (labilidade e inércia) da interação dos grupos coordenantes com a superfície das nanopartículas de ouro, bem como do impedimento estérico daqueles sítios. Assim, a presença de aminoácidos tais como cisteína e histidina, contendo resíduos que apresentam forte interação com Au^0 , é fundamental para o processo de funcionalização. Contudo, a ligação pode ocorrer numa orientação inadequada, bloqueando estericamente a porção *Fab* – sítio de reconhecimento de um único epítopo do antígeno – ou causar mudanças conformacionais em sua estrutura, consequentemente levando à diminuição da interação antígeno-anticorpo. Mesmo assim, os NBCs formados são funcionais (apesar de não

otimizados), como foi demonstrado por Zhanfang Ma [30] através do método “Imuno Dot”, de modo que são atualmente utilizados principalmente em imunoensaios [30-32] e biosensores [1-5].

Com o intuito de aumentar a sensibilidade dos métodos para detecção de analitos na área de biosensores e diagnóstico, tem-se combinado estrategicamente esses NBCs com técnicas tais como *Surface Enhanced Raman Scattering* (SERS) e *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Porter e colaboradores [33] desenvolveram um imunoensaio baseado em SERS que possibilita a detecção de antígenos em concentrações tão baixas quanto femtomolar, onde o sinal é gerado por moléculas-sonda que são bastante ativas no Raman e que foram co-imobilizadas com IgG (bifuncionalização) na superfície de AuNPs. Como explicado na seção anterior, a amplificação do sinal Raman de moléculas em algumas ordens de grandeza ocorre quando estas estão sob a influência do campo elétrico dos plasmons de superfície das nanopartículas, sendo uma ótima estratégia para desenvolver métodos de diagnóstico ultra-sensíveis. De modo semelhante, Choi e colaboradores [31] utilizaram a técnica SPR para quantificação do antígeno PSA na escala femtomolar utilizando um AuNP-IgG como NBC que liga seletivamente e amplifica o sinal SPR daquela biomolécula.

Todavia, apesar dos avanços realizados até o momento, ainda não há estudos que possibilitem prever como as biomoléculas irão se ligar às AuNPs ou em que condições os NBCs obtidos formarão suspensões estáveis em função do tipo de proteínas utilizadas. Geralmente, testes preliminares de agregação [34] são realizados visando encontrar a concentração mínima de proteína (p.ex. IgG) que deve ser usada na conjugação com as AuNPs para produzir NBCs que geram suspensões coloidais estáveis. Tipicamente, ajusta-se o pH da suspensão de AuNPs em 9 com solução 1 M de NaOH ou NaCO₃, adiciona-se alíquotas desta suspensão sobre um volume fixo da solução aquosa proteica de concentrações variadas e depois uma solução salina ou tampão para induzir a agregação das AuNPs que

estão desprotegidas e instáveis. Assim, o aparecimento da banda de acoplamento plasmônico na região acima de cerca de 550 nm, e consequente mudança de cor, é utilizado para monitorar espectrofotometricamente o grau de estabilização coloidal desses nanobioconjugados [34]. Essa limitação existe devido à falta de técnicas analíticas para estes sistemas nanométricos, pois a maioria das técnicas atuais visam caracterizar moléculas (CNH, RMN, EM, IR, Raman, etc.), sistemas micrométricos (microscópios óptico ou de fluorescência) como células, por exemplo, ou os núcleos das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Assim, a caracterização e compreensão dos nanobioconjugados ainda é um grande desafio devido a presença das biomoléculas possivelmente em diferentes conformações e orientações.

Portanto, para se sistematizar e racionalizar o processo de produção de NBCs, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos detalhados no sentido de compreender os mecanismos de interação nanopartícula-biomolécula. De fato, pouco se conhece e se discute sobre esse ponto de vista, não havendo modelos que possibilitem explicar ou prever por quais sítios de ligação deverá ocorrer essa interação. Além disso, ainda é difícil prever o grau de influência de fatores como pH, temperatura, pI, estrutura quaternária e tamanho das proteínas sobre a estabilidade e a funcionalidade dos NBCs.

1.2.4. Toxicidade de Nanobioconjugados de Ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) conjugadas a biomoléculas têm sido exploradas desde 1971, quando Faulk e Taylor [35] utilizaram pela primeira vez nanobioconjugados de AuNP-anticorpo (AuNP-IgG) como marcadores imunocitoquímicos para identificar os antígenos presentes na superfície da Salmonella. Hoje em dia, AuNPs têm sido investigadas para aplicação em diagnóstico, vetor de transfecção, entrega de drogas e de genes, tratamento por hipertermia e, como sondas para diagnóstico por imagem [15], explorando suas

propriedades ópticas e de ligação química únicas [36]. Além disso, foram previstas aplicações interessantes para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, associando AuNPs com as técnicas de espectroscopia SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) [37, 38] e SPR (*Surface Plasmon Resonance*) [31].

No entanto, controlar a estrutura da matéria nesta escala e compreender a interação de nanobioconjugados com células são tarefas desafiadoras. De fato, as propriedades físicas, químicas e de mobilidade diferenciadas de nanopartículas (NPs) em níveis celular e molecular controlam sua biodistribuição e farmacocinética [4]. Estas são essenciais para um bom equilíbrio entre as atividades farmacológicas e toxicológicas, responsáveis pela eficácia terapêutica e adequação, fundamentais para o desenvolvimento de aplicações *in vivo*. Neste contexto, a funcionalização da superfície com moléculas desempenha papel fundamental. Por exemplo, o polietileno glicol (PEG) melhora o tempo de meia-vida de NBCs no sangue [39], o IgG confere propriedades de *targeting* [40], a albumina de soro bovino (BSA) diminui a ligação não-específica/cruzada, e a proteína A apresenta seis sítios de interação específicos com a porção *Fc* de anticorpos [41]. Assim, a proteína A ancorada à superfície da AuNP pode ser usada como sítio de ligação de anticorpos, alinhando os mesmos de forma a ficar com a porção *Fab* livre e diminuindo o impedimento estérico.

Embora as nanopartículas tenham sido empregadas com sucesso em aplicações biológicas, seus efeitos tóxicos ainda não foram completamente elucidados [42]. A cinética de assimilação, biodistribuição e excreção de nanopartículas, bem como os seus mecanismos de ação, não podem ser correlacionados com os parâmetros bem definidos de seus correspondentes materiais macroscópicos [43]. Assim, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE-EUA) reforçou que as normas de saúde e de segurança permanecem indefinidos para as nanopartículas [44]. Na verdade, vários estudos atuais têm

relatado a toxicidade e efeitos indesejados causados por AuNPs em organismos, alimentando ainda mais a polêmica e discussão sobre a segurança dos nanomateriais [45, 46].

Devido à semelhança de tamanho com os componentes celulares e até de proteínas, AuNPs podem cruzar as paredes do vaso sanguíneo e, eventualmente, da barreira hematoencefálica [47]. Por isso, o tamanho, forma, composição química, carga, e estado de aglomeração das nanopartículas governam o grau de toxicidade [48]. A estabilidade coloidal, capacidade de dispersão e de interação com o meio, são controladas principalmente pela natureza da camada molecular presente em sua superfície, ou seja, a funcionalização realizada por modificações químicas [42]. A dependência da citotoxicidade em relação ao formato/geometria da nanopartícula foi explorada por Tarantola e colaboradores [49], ao mostrarem que as nanopartículas esféricas são mais tóxicas e mais facilmente internalizáveis do que aquelas em forma de bastonete através do monitoramento de células epiteliais incubadas, separadamente, com esferas e bastonetes de ouro recobertos com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Paino e colaboradores [45] apontaram que AuNPs revestidas com citrato e poliamidamina (PAMAM) exibem cito- e genotoxicidade dependente da quantidade administrada de 0,01 a 50 μM em células de carcinoma HepG2. Goodman e colaboradores [50] mostraram que AuNPs catiônicas são moderadamente citotóxicas em contraste com os seus homólogos aniônicos, como esperado devido à sua alta interação eletrostática com biomoléculas. Por outro lado, nanopartículas de ouro de 14-100 nm revestidas com ácido cítrico foram internalizadas por células HeLa, mas não causaram morte celular [51]. Resultados semelhantes foram relatados por Connor e colaboradores [52], onde esferas de ouro de 4 nm recobertas com cisteína ou citrato, de 12 nm recobertas com glicose reduzida, e de 18 nm recobertas com citrato, biotina ou CTAB mostraram-se não tóxicas para células de leucemia humana. Além disso, AuNPs de 5 nm recobertas com polivinilpirrolidona (PVP) apresentaram-se biocompatíveis com células de fígado de rato [53]. Já a administração

sistêmica de AuNPs provocou atividades pro e anti-inflamatórias [54, 55]. Os efeitos sobre a inflamação causada por AuNPs são controversos e isso está correlacionado às diferentes propriedades físico-químicas das nanopartículas. A injeção intraperitoneal (i.p.) de AuNPs (21 nm) em camundongos C57BL/6 reduziu os níveis de mRNA de interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral (TNF- α) na gordura abdominal dos animais [54]. Por outro lado, a injeção de AuNPs (10 ou 50 nm) na cavidade peritoneal de ratos Wistar-Kyoto aumentou a expressão de genes de citocinas no fígado [55].

O primeiro contato de compostos administrados i.v. em um organismo é sempre com os componentes do sangue e as paredes dos vasos sanguíneos. Considerando-se a ação funcional e metabólica das células que constituem o sangue e os vasos, os efeitos tóxicos poderiam prejudicar a homeostase, além de causar trombose, coagulação, inflamação, imunossupressão e hipertensão [56]. Embora a administração de AuNPs via i.v. tenha sido proposta, não foi encontrado nenhum relato na literatura sobre o efeito de nanopartículas de ouro no sistema vascular, em particular sobre a interação com eritrócitos, leucócitos e células da parede do vaso na microcirculação. Para preencher essa lacuna, os efeitos *in vitro* e *in vivo* de bioconjugados de AuNP em células do sangue e do sistema microvascular foram investigados. AuNPs não causaram a morte das células do sangue nem dos vasos, inibiram as interações leucócito-endotélio em microvasos e as funções de neutrófilos.

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Método de Turkevich

As nanopartículas de ouro (AuNPs) com diâmetros médios entre 12 e 50 nm foram preparadas pelo método de Turkevich/Frens [57-59], também conhecido como método do citrato, que se caracteriza pela sua simplicidade e eficácia. O método de preparação é adequado para a obtenção de nanopartículas com distribuições de tamanhos relativamente estreitas por meio do controle do processo de nucleação, enquanto o diâmetro médio é definido por fatores como a relação $[\text{AuCl}_4]/[\text{citrato}]$ e a concentração de moléculas protetoras. Idealmente, a nucleação dos clusters de Au^0 deve acontecer simultaneamente em todo o volume da solução, de forma homogênea, para que se formem nanopartículas monodispersas. Para tanto, é fundamental controlar a rapidez do processo de adição do agente redutor e a agitação da mistura reacional. Assim, foram estudadas algumas modificações visando a obtenção de nanopartículas de ouro com uma distribuição de tamanho ainda mais estreitas.

Tipicamente, 3 mL da solução 1% em massa de citrato de sódio (Sigma) foram adicionados rapidamente a uma solução preparada pela solubilização de 16 mg de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma) em 100 mL de água deionizada (resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25 °C) em ebulição e sob forte agitação. Rapidamente, a coloração da mistura reacional mudou de alaranjado para vermelho vinho indicando a formação de nanopartículas de ouro de cerca de 20 nm estabilizadas por citrato. Finalmente, o sistema foi deixado sob agitação, mas sem aquecimento, até atingir a temperatura ambiente e depois mantido sob refrigeração a 4 °C para futuras aplicações. Estas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis num espectrofotômetro HP8453A de matriz de diodos do LQSN, sua distribuição de tamanho e medida de potencial- ζ foram realizadas no equipamento Malvern ZEN3600

Zetasizer Nano ZS equipado com laser verde de 633 nm do laboratório da Prof^a Iolanda M. Cuccovia do IQUSP, microscopia eletrônica de varredura (SEM) no microscópio de emissão de campo Jeol JSM7401-F da Central Analítica do IQ-USP e de transmissão (TEM) do LME coordenado pelo Professor Pedro Kiyohara do IFUSP. Imagens de MET foram registradas em um microscópio Philips CM200, operando a 160 kV. As amostras foram preparadas por deposição dos nanomateriais sobre redes (grids) de cobre cobertos com filme de carbono.

Foram realizados também alguns estudos sobre o efeito da variação de algumas condições de síntese das AuNPs visando maior controle e reprodutibilidade, além de uma distribuição de tamanho mais estreita. Para tanto, a proporção entre os reagentes foi mantida em todos os casos, mas foram feitas as seguintes modificações no método de síntese: 1) adicionou-se uma solução de citrato pré-aquecido a 60 °C no sistema convencional (balão volumétrico de fundo chato), 2) utilizou-se um sistema fechado em refluxo para aumentar um pouco mais a temperatura da síntese, além de usar solução de citrato de sódio pré-aquecido a 60 °C e 3) a síntese foi realizada num sistema aberto dentro de um reator de microondas, usando uma taxa de aquecimento de 100 °C/min e solução de citrato de sódio pré-aquecido a 60 °C.

1.3.2. Nanobioconjugados

Os bioconjugados de AuNP foram preparados através da reação espontânea entre a suspensão de *cit*-AuNP com quantidades adequadas de anticorpos (IgG) monoclonais anti-H3.3 de camundongo produzidos por uma cultura de hibridomas (seção 1.2.2.1), albumina bovina (BSA), proteína A e polietileno glicol de peso molecular 4.000 (PEG4000), todos dispersos em água deionizada (18,2 MΩ.cm⁻¹). Eles devem recobrir a superfície das AuNPs para evitar a agregação das nanopartículas. Assim, as quantidades adequadas dependem do tamanho e da carga das biomoléculas. A interação entre as nanopartículas de ouro e as

biomoléculas ocorre espontaneamente por auto-montagem, e foi realizada na proporção 1:10 v/v de proteína e AuNPs. A proteína deve estar em excesso em relação à quantidade necessária para recobrir toda a área superficial das AuNPs, garantindo, assim, a estabilidade do NBC formado. Esta concentração mínima pode ser encontrada titulando-se uma quantidade fixa de AuNP com a biomolécula, mantendo-se o fator de diluição constante (método de Jobs), sendo que esta condição depende das características de cada biomolécula. A caracterização desses NBCs foi feita por espectroscopia UV-Vis, DLS, medidas de potencial- ζ e TEM utilizando-se os mesmos equipamentos descritos na seção 1.2.1. Os estudos foram realizados variando-se a concentração relativa de proteína em relação às AuNPs, o pH, a força iônica, o eletrólito e o tamanho (massa molecular) das biomoléculas, com o intuito de estudar a influência desses fatores.

1.3.2.1. Produção e Purificação de Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mIgG) foram produzidos pela Professora Maria Julia Manso Alves do Laboratório de Bioquímica de Parasitas do IQ-USP, por meio do método de cultura de hibridomas [60], ou seja, células imortalizadas *in vitro*, capazes de secretar IgG monoclonal em grande quantidade. Estes hibridomas foram obtidos pela fusão do linfócito B, que produz o IgG monoclonal desejado, com uma célula de mieloma.

Camundongos foram imunizados por injeção intravenosa do antígeno de interesse juntamente com adjuvantes, semanalmente por cerca de 10 semanas, com doses progressivamente menores. Os linfócitos B presentes no baço do animal imunizado foram retirados e posteriormente fundidos com células do mieloma, formando o hibridoma. Este foi cultivado e multiplicado em um meio de cultura contendo principalmente BSA e fatores de crescimento por cerca de um mês, de modo que a concentração da IgG monoclonal no sobrenadante atinja cerca de 1 mg/mL. Nesse momento, as células foram separadas por

centrifugação e o sobrenadante processado por precipitação, diálise e finalmente, purificação em coluna de afinidade como descrito abaixo.

A precipitação da mIgG e de algumas proteínas contaminantes foi realizada com sulfato de amônio, sob agitação constante, à temperatura de 4 °C. Em seguida, o precipitado foi separado por centrifugação a 9.500 rpm por 30 minutos e ressuspensão em 5% em volume de PBS e dialisado em 3 L do mesmo tampão, sob agitação, a 4 °C. O mIgG foi purificado em coluna de afinidade (resina *Protein A Sepharose 4 Fast Flow*), que se liga especificamente à porção *Fc* dos anticorpos. A solução foi submetida à agitação vertical por cerca de 4 h, em alíquotas de 10 ml, e a solução remanescente drenada. Finalmente, o mIgG retido na resina foi eluído adicionando-se 10 ml de solução de citrato de sódio pH 3, e recolhido em 10 alíquotas de 1 ml. O pH foi corrigido com 10% em volume de tampão Tris 1M pH 6,8 e armazenadas no freezer.

1.3.2.2. Produção, Deslipidação e Purificação de Anticorpos

Policlonais

Os anticorpos policlonais (pIgG) foram produzidos através da imunização [60] de um coelho com extrato total de formas tripomastigotas (infecciosas) de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Foi aplicada uma dose a cada duas semanas durante 3 meses e a partir da quarta dose, a quantidade sérica de anticorpo anti-tripomastigota (título) foi monitorada por imunofluorescência indireta com parasitas fixados.

O extrato total de formas tripomastigotas foi preparado a partir de cerca de 10^9 parasitas/tubo. Primeiramente, centrifugou-se por 5 minutos a 13.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e esfriou-se, rapidamente, o pellet em nitrogênio líquido. Em seguida, descongelou-se e ressuspendeu-se o pellet em 500 µL de PBS gelado. A ruptura dos parasitas

foi feita por agitação em Vortex por cinco vezes com pulsos de 10 s cada, dosando-se a quantidade de proteína total pelo método de Bradford (BioRad).

O coelho foi inoculado com doses de 0,5 mg de antígeno por mL através de injeções intravenosas de emulsões preparadas com 50% m/m de 0,5 mg/mL do antígeno de interesse em PBS (fase aquosa) e 50% de adjuvante (fase oleosa). A primeira dose foi preparada com adjuvante de Freund completo e as outras com adjuvante de Freund incompleto. O adjuvante completo de Freund (em homenagem a Jules T. Freund (1890-1960) imunologista americano nascido na Hungria) é composto por uma emulsão do tipo água em óleo contendo micobactéria morta pela ação do calor ou componentes de sua parede celular e é efetivo em potencializar a resposta imune humoral e celular contra imunógenos co-administrados. O adjuvante incompleto não apresenta o conteúdo micobacteriano, por isso é menos efetivo do que o completo e foi utilizado nos inóculos seguintes.

Após atingir um título acima de 4000 vezes, fez-se a sangria do coelho pela veia da orelha e, em seguida, o animal foi sacrificado conforme descrito na proposta aprovada pela CECUA. O sangue permaneceu a 37 °C por 30 minutos e depois a 4 °C por mais 30 minutos para acelerar o processo de contração do coágulo. A suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 10 minutos para se obter o soro rico em pIgGs anti-tripomastigotas. A purificação foi feita por precipitação do soro com 50% m/m de sulfato de amônio, sob agitação constante, à temperatura de 4 °C. Em seguida, o precipitado foi separado por centrifugação a 9.500 rpm por 30 minutos e ressuspenso em 5% em volume de PBS e dialisado em 3 L do mesmo tampão, sob agitação, a 4 °C. O pIgG foi purificado em coluna de afinidade (resina *Protein A Sepharose 4 Fast Flow* – *Pharmacia Biotech*), que se liga especificamente à porção *Fc* dos anticorpos. A solução foi submetida à agitação vertical por 4 h, em alíquotas de 10 mL, e a solução remanescente drenada. Finalmente, o pIgG retido na resina foi eluído adicionando-se 10 mL de solução de citrato de sódio pH 3, e recolhido em 10 alíquotas de 1 mL. Essas

frações foram corrigidas com 10% em volume de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 para alcalinizar o meio, dialisadas novamente contra PBS, aliquotadas e armazenadas no freezer. Esses anticorpos foram armazenados para a realização de experimentos durante todo o período do doutoramento.

As separações por centrifugação foram feitas na ultra-centrífuga RC5C da Sorvall Instruments, a 4 °C, entre 10.000 e 20.000 rpm dependendo da amostra. A concentração de proteínas BSA e IgG foi avaliada no espectrofotômetro NanoDrop 1000 da *Thermo Fisher Scientific*, utilizando-se o modo *Protein A280* que converte a absorbância medida a 280 nm na concentração da proteína em mg/mL. No programa existe uma curva de calibração para cada tipo de proteína (IgG, BSA, dentre outras proteínas), que deve ser utilizada para o cálculo da concentração.

Para fins comparativos, a quantificação de proteínas também foi realizada pelo método de Bradford. A medida da densidade óptica dos poços da placa de 96-poços, em 595 nm, foi analisada no leitor de ELISA Synergy HT da BIO-TEK Instruments utilizando-se uma curva de calibração com albumina.

Deslipidação de Anticorpos

Devido à grande quantidade de lipídeos presentes no soro, os anticorpos ainda presentes nos sobrenadantes da coluna de afinidade da primeira purificação (seção anterior) foram deslipidados e, em seguida, o mesmo processo de purificação com coluna de afinidade foi realizado, mas com algumas modificações. Essa amostra do sobrenadante foi utilizada, pois foi identificada a presença de anticorpos em quantidade razoável no SDS-PAGE, provavelmente devido à saturação da coluna de proteína A-sefarose. A deslipidação foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido pelas pesquisadoras Dra. Eliana Faquim e Dra. Irene Fernandes do Instituto Butantan.

Foram adicionados 20 μL de uma solução de sulfato de dextrana a 10% e 0,1 mL de uma solução de CaCl_2 1,0 M por mL de soro. As amostras foram agitadas por 15 minutos e em seguida centrifugadas a 5.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante, que corresponde ao soro isento de lipídios, foi recuperado e dialisado contra PBS. O dialisado foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C, filtrado em filtro Millipore de 0,22 μm e aplicado na coluna de afinidade Proteína A-sefarose. Depois de 2 horas em contato e sob agitação, o sobrenadante da coluna foi recolhido e guardado, e posteriormente eluído com tampão glicina 0,1 M pH 3,0 e a fração eluída dialisada contra PBS por uma noite.

Os pIgG purificados foram quantificados usando o equipamento Nanodrop e caracterizados por SDS-PAGE. Finalmente as amostras foram congeladas em alíquotas de 1 mL para posterior utilização.

1.3.2.3. Produção e Purificação das Porções *Fab* e *F(ab')₂*

Os fragmentos *Fab* e *F(ab')₂* dos anticorpos policlonais do coelho foram inicialmente produzidos por meio da digestão com enzimas livres (sem estarem conjugadas) de papaína e pepsina (Sigma). Na época, foram variadas algumas condições experimentais na busca daquela mais apropriada para esta digestão, mas por praticidade, eficiência e para não ter contaminação final de papaína e pepsina nas amostras de *Fab* e *F(ab')₂*, respectivamente, optou-se por utilizar enzimas imobilizadas em micropartículas (Thermo), seguindo o protocolo do fornecedor como descrito abaixo.

Digestão de Anticorpos com Papaína [61]

As amostras de anticorpo foram previamente dialisadas contra tampão de amostra constituído de fosfato de sódio 20 mM com EDTA 10 mM, pH 7,0. Momentos antes do início da reação enzimática, o tampão de digestão foi preparado pela adição da respectiva massa

(concentração final de 20 mM) de cisteína-HCl no tampão de amostra preparado e ajustando-se o pH final para 7,0. Para equilibrar o gel contendo a papaína imobilizada com o tampão de digestão, adicionou-se 0,5 mL desse gel em um tubo e em seguida 4 mL do tampão de digestão. Para separar o gel desse tampão, centrifugou-se o tubo a 1000 rpm por um minuto e descartou-se o sobrenadante. Esse processo de lavagem foi repetido mais uma vez e finalmente, ressuspendeu-se o gel com 0,5 mL desse tampão de digestão. Para iniciar a digestão, 0,5 mL do tampão de digestão foi adicionado sobre a amostra de pIgG e em seguida, adicionada no tubo contendo a papaína imobilizada. Incubou-se por 8 horas a 37 °C sob constante agitação. Para separar os fragmentos *Fab* da papaína imobilizada, foram adicionados 1,5 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 no tubo e centrifugado a 1.000 rpm por um minuto. O sobrenadante, rico em fragmentos *Fab*, foi dialisado contra PBS por uma noite e purificado por cromatografia de afinidade em coluna de Proteína A-Sefarose (*Pharmacia Biotech*), utilizando-se tampão borato (TBS) 0,2 M pH 8,5 para fazer a eluição. Finalmente as amostras foram congeladas em alíquotas de 1 mL para posterior utilização.

Vale ressaltar que os fragmentos *Fab* não interagem com a coluna, somente os IgGs não-digeridos e os fragmentos *Fc* (produto da clivagem). Por isso as frações de interesse são aquelas iniciais que saem junto com a frente de eluição.

Digestão de Anticorpos com Pepsina [62]

O tampão de digestão foi preparado com acetato de sódio 20 mM pH 4,5 pela fato da reação enzimática ser mais efetiva. Por isso, as amostras de anticorpo foram previamente dialisadas contra esse mesmo tampão acetato. Para equilibrar o gel (pepsina imobilizada) com o tampão de digestão, foram adicionados 0,25 mL do gel em um tubo e, em seguida, 4 mL do tampão de digestão. Para separar o gel do tampão, o tubo foi centrifugado a 1.000 rpm por um minuto e o sobrenadante descartado. Esse processo de lavagem foi repetido mais uma vez e

finalmente, o gel foi ressuspenso em 0,5 mL do tampão de digestão. Para iniciar a digestão, a amostra de IgG dialisada contra o tampão de digestão foi adicionada ao tubo contendo a pepsina imobilizada, e incubada por 8 horas a 37 °C, sob constante agitação. Para separar os fragmentos $F(ab')_2$ da pepsina imobilizada, foram adicionados ao tubo 1,5 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e centrifugado a 1.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante, rico em fragmentos $F(ab')_2$, foi dialisado contra PBS por uma noite. Nenhuma purificação posterior foi realizada antes do uso.

Ambos os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ foram quantificados no equipamento Nanodrop e caracterizados por SDS-PAGE 12% e ELISA, utilizando-se o mesmo protocolo descrito na seção anterior. Finalmente as amostras foram aliqüotadas de 1 em 1 mL e congeladas para posterior utilização.

1.3.3. Estudo de Estabilidade dos Nanobioconjugados

Para melhor compreender os fatores que estão relacionados com a estabilidade coloidal dos nanobioconjugados de ouro (NBCs) como pH, tamanho e pI da proteína, o estudo abaixo foi realizado utilizando NBCs produzidos com *cit*-AuNPs (~18 nm de diâmetro) e proteínas de diferentes tamanhos e pontos isoelétricos conforme mostrado na **Tabela 1**.

Nanopartículas de ouro conjugadas a anticorpo policlonal anti-tripomastigota (seção 1.2.2.2), albumina bovina (Sigma), proteína A (Molecular Probes, *staphylococcus aureus*) ou lisozima (Sigma) foram produzidas controlando-se o pH em 5, 7 e 9. Para tanto, a suspensão de *cit*-AuNP foi vagarosamente adicionada sobre tampão fosfato 1 M no pH desejado na proporção de 99:1 v/v, sob agitação de 4.000 rpm, momentos antes de realizar a interação com as proteínas.

Os ensaios foram realizados transferindo-se 20 µL de solução proteica, com concentração variando de 20 a 60 µg/mL da proteína, para os poços de uma placa de

microtestes com 96 poços. Em seguida e sob agitação, sobre elas foram adicionados 180 μL da suspensão de AuNP 2 nM com pH previamente ajustado, completando o volume para 200 μL por poço. Finalmente, a estabilidade coloidal dos NBCs formados foi acompanhada espectrofotograficamente através da leitura da placa no leitor de ELISA Synergy HT da BIO-TEK Instruments, por meio da medida da densidade óptica de cada poço na faixa de 401 a 999 nm.

Os ensaios foram feitos em triplicata para cada tipo de amostra, usando como branco soluções preparadas adicionando-se 20 μL da solução proteica 60 $\mu\text{g/mL}$ em 180 μL de água. Para fins de comparação, soluções preparadas adicionando-se 20 μL de água em 180 μL da suspensão de AuNP e pH ajustados para 5, 7 ou 9 também foram utilizados como branco. Como o grau de agregação dos NBCs é dependente do tempo, principalmente para aqueles que tem menor estabilidade coloidal, os ensaios foram realizados mantendo-se constantes os tempos em que foram realizadas as medidas.

Tabela 1: *Peso molecular (kDa) e ponto isoelétrico das proteínas escolhidas para o estudo de estabilidade dos nanobioconjugados de ouro.*

Proteína	Peso molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico
Anticorpo policlonal ^a	150	7,5 – 8,5
Albumina bovina ^b	67	4,9
Proteína A ^c	44-45	5,1
Lisozima ^d	14,3	11,3

Informações obtidas do(a):

a. livro “Antibodies: A Laboratory Manual” [61]

b. Sigma (A2153)

c. *Molecular Probe*

d. Sigma (L7651)

1.3.4. Toxicidade Hematológica e Microvascular *In vivo* e *In vitro* de AuNPs e de Seus Bioconjugados

Visando evidenciar o potencial de aplicações médicas, principalmente teragnósticas, de nanopartículas de ouro e seus bioconjugados, é fundamental estudar os efeitos tóxicos que estas podem causar ao sistema hematológico e microvascular, pois a maioria das aplicações *in vivo* dependem da administração intravenosa desses nanoconjugados. Os ensaios descritos abaixo foram realizados com bioconjugados obtidos pela ligação de mIgG de camundongo anti-H3.3 (descrito na seção 1.2.2.1), albumina de soro bovino (BSA, Sigma), proteína A (Pharmacia) e PEG4000 (Sigma) à superfície das AuNPs. Este trabalho foi realizado em colaboração com a Profª Drª Sandra Farsky, Dr. Stephen Rodrigues, Drª Simone Bolonheis e Carine Drewes da FCF-USP, além do prof. Dr. Pedro Kiyohara do IF-USP.

De forma geral, células mono- e polimorfonucleares obtidas e separadas de sangue humano fresco de doadores sadios do sexo masculino e células endoteliais de veia de cordão umbilical humano em cultura (HUVEC) foram incubadas por 18 horas com as *cit*-AuNPs e seus bioconjugados. Em seguida, foi determinada a viabilidade celular por meio da contagem celular em microscópio óptico usando azul de tripano e, também, por citometria em fluxo usando anexina como marcador de apoptose e iodeto de propídeo como marcador de necrose. Também foi investigada a influência das AuNPs sobre as características reológicas do sangue e sobre a parede dos vasos sanguíneos *in vivo*, e como estas afetam a interação leucócito-endotélio, pelo ensaio de microscopia intravital usando a microcirculação mesentérica de ratos Wistar machos como modelo de estudo. Além disso, visando avaliar o efeito das AuNPs sobre o processo inflamatório, foram realizados ensaios de expressão da molécula-1 de adesão celular plaquetária-endotelial, de quimiotaxia e de ativação de estresse oxidativo em neutrófilos de ratos Wistar machos após estimulação com leucotrieno B4 (LTB4), um receptor de membrana dependente de estímulo. Para confirmar a ação intracelular direta das AuNPs no processo inflamatório *in vitro*, foi avaliada a expressão da ativação de estresse oxidativo de neutrófilos previamente tratados com acetato de forbol-miristato (PMA) e depois

estimulados com AuNPs. Células incubadas com AuNPs foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia hiperespectral de campo escuro (Cytoviva®) com o intuito de verificar a presença de partículas no seu interior (*cellular uptake*).

Esse estudo foi realizado seguindo estritamente as recomendações contidas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health” (*NIH Publication* 8523). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (Certificado N°: 15/2012), o qual segue a regulamentação do CONCEA (Conselho Nacional de Cuidado e Experimentação Animal) do Brasil.

Toxicidade em Células Humanas do Sistema Vascular

Os efeitos citotóxicos de *cit*-AuNP e seus bioconjugados no sistema vascular foram avaliados utilizando leucócitos circulantes, eritrócitos humanos e HUVEC. Células mononucleares (PBMC) e polimorfonucleares (PMN) humanas foram isoladas como descrito por Boyum [63]. 10 mL de sangue humano foram coletados em heparina (10 U/mL) e diluído na proporção de 1:1 com PBS 10 mM, pH 7,4. Este foi então transferido lentamente com o auxílio de uma pipeta descartável para um tubo de centrifugação de 50 mL, inclinado a 45° e contendo previamente 10 mL de Ficoll-Hypaque (gradiente Histopaque, $d=1.077$), de modo a formar um sistema bifásico conforme **Figura 7A**. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente (T.A.), resultando na separação da mistura em quatro fases que estão enumeradas na **Figura 7B**. Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences) consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa e forma um gradiente de densidade quando submetido à centrifugação. Por isso é utilizado corriqueiramente em laboratórios de análises

clínicas para separação dos componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e outros).

As fases 1 e 3, indicadas na **Figura 7B**, correspondentes ao soro e ao histopaque, foram descartadas. A fase 2 rica em PBMC, foi coletada e adicionada a outro tubo de centrifugação de 50 mL para lavagem, o volume completado a 35 mL com PBS e centrifugado a 400 g por 5 minutos a T.A. A fase 4 rica em eritrócitos e PMN, foi ressuspensa em 20 mL de dextran 4% (MM=150.000, D4876 Sigma) e dissolvida em PBS para efetuar sua separação. Para isso, o tubo foi deixado no gelo por 30 minutos, inclinado a 45°, para conservar as células vivas e induzir sedimentação dos eritrócitos. O sobrenadante rico em granulócitos foi coletado e adicionado a outro tubo de centrifugação de 50 mL para efetuar sua lavagem conforme descrito acima para a fase 2, mas agora a 4 °C.

Figura 7: *Tubos de centrifugação de 50 mL contendo o sangue e o gradiente histopaque antes (A) e depois da centrifugação (B). Onde (A) contém as fases (1) sangue e (2) gradiente histopaque, (B) contém (1) soro, (2) células mononucleares, (3) histopaque e (4) eritrócitos e células polimorfonucleares.*

Em seguida, os pellets de ambos os tubos foram submetidos à lise hipotônica com água deionizada gelada para remover os eritrócitos ainda presentes. No tubo contendo as células PMN, 10 mL de água foram adicionados e agitados suavemente durante um minuto. Logo em seguida, foram adicionados 5 mL de NaCl 2,7% a fim de corrigir a força-iônica do

meio. O volume foi completado para 35 mL com PBS e a suspensão centrifugada a 400 g por 5 minutos, a T.A.. O mesmo procedimento foi realizado com o tubo contendo PBMC, exceto pelo fato do tempo de interação com a água ter sido menor, de 30 segundos. Se necessário, este processo de lise hipotônica poderia ser repetido.

Finalmente, cada pellet foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI e a contagem celular realizada utilizando-se um hemocitômetro (câmara de Neubauer). A amostra foi preparada diluindo-se uma alíquota da suspensão celular em uma solução de corante Turk na proporção 1:20 v/v para gerar um contraste entre o meio externo e interno e, assim, facilitar a visualização e contagem das células. O procedimento de contagem de células está descrito mais detalhadamente no **Apêndice 3**.

As células HUVEC foram cultivadas em placas de cultura e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS). As células foram mantidas a 37 °C, umidade relativa mínima de 95%, e atmosfera com 5% de CO₂.

A fim de investigar a citotoxicidade, 1×10^6 células PMN ou PBMC/poço ou 1×10^5 de células HUVEC/poço foram semeadas em placas de 24 poços com 400 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de FBS (R10). Estas foram incubadas, separadamente e em triplicata, com 100 µL da suspensão de *cit*-AuNP e com cada nanobioconjugado (cerca de 1×10^{11} partículas/poço), ou somente com as respectivas moléculas funcionalizantes, durante 18 horas, a 37 °C. Em seguida, as células foram incubadas durante 20 minutos com anexina-V FITC (1:100 v/v) e iodeto de propídio (PI) (10 mL, 50 µg/mL), e analisadas em um citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton e Dickinson, San José, CA, EUA) usando etanol e DMSO como controles positivos para apoptose e necrose, respectivamente. Os dados de 10.000 eventos foram analisados e os resultados expressos como porcentagem de células viáveis e de células que sofreram apoptose, necrose e apoptose tardia (dupla marcação).

Para fins de comparação, a viabilidade celular também foi avaliada por teste de exclusão por azul de tripano (corante de coloração azul escura intensa). Este consiste na contagem celular utilizando um microscópio óptico e um hemocitômetro, onde as células vivas permanecem inalteradas (não-coradas) e as mortas coradas de azul escuro. Este corante é *supravital*, por isso células mortas com membranas rompidas são coradas pela entrada do corante em seu citoplasma. O procedimento de incubação com as AuNPs e seus bioconjugados foi idêntico ao descrito acima, e após este período, as placas de cultura foram retiradas da estufa, e alíquotas de 90 μL do meio de cultura separadas e tratadas com 10 μL de azul de tripano 0,4%. Rapidamente fez-se a contagem de 100 células numa região com distribuição homogênea entre células vivas e mortas, utilizando os quadrantes da câmara de Neubauer como referência. O azul de tripano difunde-se para dentro das células vivas em poucos minutos, o que poderia acarretar em um resultado falso positivo. Por isso, as contagens foram realizadas imediatamente após sua adição em cada poço.

Para complementar o estudo de toxicidade no sistema vascular, foi realizado o teste de hemólise de sangue humano doado por voluntários sadios do sexo masculino. Os glóbulos vermelhos (RBC) foram incubados com as *cit*-AuNPs e seus bioconjugados e a atividade hemolítica avaliada de acordo com o método descrito por Sharma e Sharma [64]. Brevemente, o sangue humano foi colhido em solução 0,13 M de citrato de sódio em PBS para evitar a formação de coágulos, centrifugado (1300 g, 15 min), e os glóbulos vermelhos recolhidos e lavados com PBS. O sedimento foi ressuspensão em PBS, numa concentração final de 10% v/v de RBC. Alíquotas de 500 μL foram incubadas com 100 μL de *cit*-AuNP e de cada bioconjugado (cerca de 1×10^{11} nanopartículas) durante 1 hora, a 37 °C e sob agitação orbital. A densidade óptica (OD) do sobrenadante obtido após centrifugação de cada amostra foi monitorada a 540 nm (Spectramax Plus 384, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, EUA). O controle positivo (100% de hemólise) foi preparado incubando 500 μL da suspensão de RBC

com 100 µL de solução aquosa 0,2% de Triton X-100. A absorbância das AuNPs (500 µL de PBS e 100 µL de cada bioconjugado de AuNP) em 540 nm foi subtraída do valor da absorbância da amostra real avaliada correspondente. Além disso, um controle negativo para corrigir a linha de base de todas as amostras foi também preparado incubando 500 µL da suspensão de RBC com 100 µL de água deionizada, o meio de dispersão das nanopartículas. A porcentagem de hemólise induzida pelas AuNPs foi calculada como se segue: % de hemólise = $100 \times (\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância correspondente a 100\% de hemólise induzida por Triton X-100})$, além de fazer as correções necessárias com cada controle acima descrito. O teste de hemólise também foi realizado apenas com as moléculas funcionalizantes (biomoléculas), pois caso a hemólise de algum bioconjugado fosse significativa, poderia haver dúvidas se foi a AuNP ou sua molécula funcionalizante que causou a lise.

Todo o material foi previamente desinfetado com hipoclorito de sódio e devidamente descartado em materiais infectados e incinerado em virtude da presença de sangue humano. Todas as centrifugações foram realizadas com a centrífuga 5702 R da Eppendorf.

Estudo In Vitro da Internalização de AuNPs por Células

Estudos de microscopia foram realizados para confirmar a possível internalização de AuNPs em leucócitos circulantes humano, HUVEC e neutrófilos de rato através da incubação de 400 µL de cada tipo de célula em meio de cultura RPMI (10% FBS) com 100 µL de *cit*-AuNP ou AuNP-IgG (cerca de 1×10^{11} nanopartículas), durante 18 horas.

Células PMN e PBMC foram fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS durante 2 horas a 4 °C, pós-fixadas em 1% de OsO₄ em 0,1 M PBS durante uma hora, lavadas com PBS e centrifugadas (1300 g, 15 min). O *pellet* de células foi corado com 2% de acetato de uranilo durante 30 minutos a 60 °C, lavado três vezes com água deionizada, desidratado com soluções de concentrações progressivamente mais elevadas de etanol e, em seguida, em 100%

de óxido de propileno e embebido em resina epóxi. Secções finas foram cortadas usando um ultramicrotomo Reichert Ultracut E, postas em grades de cobre de 200 malhas e coradas com citrato de chumbo. Imagens das células PMN e PBMC foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 operando a 100 kV.

Neutrófilos de ratos (4 horas após a injeção i.p. de solução de glicogênio de ostra a 1%) e HUVECs foram visualizados utilizando um microscópio que combina reflectância de campo escuro e imagem hiperespectral. Esse sistema CytoViva® de imagem apresenta alta resolução (cerca de 80 nm) e faz uso de um microscópio Olympus BX51, uma objetiva de NA 0,5 e uma fonte de luz de Xe de 75W. O sistema hiperespectral foi calibrado usando uma lâmpada padrão de calibração de comprimento de onda (baixa pressão de Hg, Lightform, Inc.). As imagens foram normalizadas pixel-a-pixel utilizando-se o espectro da lâmpada de Xe. As imagens com padrão de cores vermelho-verde-azul (RGB) foram tiradas com uma câmera CCD Q-imaging Retiga EXi, com acessório de cor LCD em condições idênticas e equilíbrio de branco com o Software de Processamento de Imagem Espectral (Labsphere, North Sutton, New Hampshire). Um mínimo de 50 células foi analisado por campo.

Alterações no Sistema Microvascular e Efeitos Anti-Inflamatórios In Vivo

Ratos Wistar machos (300-400 g) foram divididos em cinco grupos, de acordo com os tratamentos i.v.: 1. Salina (cloreto de sódio 0,9% m/m); 2. Água deionizada; 3. IgG dissolvido em água deionizada; 4. *cit*-AuNP; e 5. AuNP-IgG. Depois da anestesia por via subcutânea com solução de cetamina (100 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg), a veia femoral esquerda foi canulada e uma dose única de 1 mL foi aplicada. Cada tratamento foi injetado i.v. a uma taxa de infusão de 500 μ L/min. A água deionizada foi utilizada como controle devido às suspensões de *cit*-AuNP e AuNP-IgG (cerca de 1×10^{11} nanopartículas/mL, 8×10^{-5} g Au/mL) terem sido preparadas nesse solvente. O bioconjugado AuNP-IgG (AuNPs revestidas com

anticorpo monoclonal contra tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*) [65] foi utilizado para avaliar a influência de uma biomolécula sobre as propriedades toxicológicas de AuNPs no sistema vascular, além de apresentar o maior potencial para aplicações médicas.

Laparotomia medial foi realizada nos ratos canulados e o mesentério foi exteriorizado para efetuar seu exame microscópico *in situ*. A cirurgia e a manutenção da microcirculação do mesentério do animal foram realizadas seguindo os protocolos descritos por Macedo [66] e de Lima [67].

A adesão de leucócitos na parede interna dos vasos sanguíneos e a migração destes a partir do interior dos vasos sanguíneos para o tecido do parênquima sob a influência de AuNPs foram quantificadas. O número total de leucócitos aderidos (por 100 μm de vênula) e migrados (5000 μm^2 numa área padrão de tecido conjuntivo adjacente a uma vênula pós-capilar) foram determinados em função do tempo (antes da injeção, imediatamente após, e depois de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 horas após a injeção). Para evitar erros devido a variabilidade associada, três vasos diferentes foram avaliados para cada animal e os resultados médios foram apresentados.

Outro conjunto de ensaios foi realizado para investigar o efeito anti-inflamatório do bioconjugado AuNP-IgG evocado pela aplicação tópica de leucotrieno B4 (LTB4) (10^{-9} M). AuNP-IgG foi administrada i.v. 30 minutos antes da estimulação por LTB4. Avaliou-se o número de leucócitos aderidos, nos mesmos intervalos de tempo descritos acima.

Efeito das AuNPs Sobre as Funções dos Neutrófilos: Atividade Anti-Inflamatória

Os neutrófilos de ratos foram obtidos após 4 horas de injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 ml de solução de glicogênio de ostra estéril a 1%. As células viáveis (98%) foram contadas numa câmara de Neubauer (hemocitômetro) utilizando um microscópio óptico Nikon (Japão). Os neutrófilos (1×10^5 células/poço) foram tratados com RPMI suplementados com

10% de FBS (R10, controle), sobrenadante da suspensão da síntese de AuNP contendo citrato (cit) e seus produtos de oxidação, mIgG, *cit*-AuNP e AuNP-IgG (cerca de 1×10^{11} nanopartículas/100 mL), e utilizados para os ensaios de quimiotaxia, estresse oxidativo e de expressão de moléculas de adesão.

O ensaio de quimiotaxia (migração celular por estímulos químicos) foi realizado usando uma câmara de quimiotaxia de multi-poços (Boyden), e filtros com tamanho de poro de 8 μm (Sistema Chemo Tx, Neuro Probe, EUA) com um poro por poço, como previamente descrito por de Lima [67]. Em resumo, os poços da câmara de Boyden foram preenchidos com soluções tampão HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma) e 1×10^{-8} M de leucotrieno B4 (LTB4) até tocarem os filtros. Então, uma gota contendo neutrófilos foi pipetada sobre o poro do filtro de cada poço, e incubados durante duas horas (37 °C; 5% CO₂). Os filtros foram removidos e o número de neutrófilos migrados contado por microscopia óptica (Nikkon, Japão) numa câmara de Neubauer.

Neutrófilos tratados com AuNPs foram incubados com LTB4 (1×10^{-8} M), acetato de forbol-miristato (PMA) (1×10^{-8} M) ou R10 (2h, 37 °C), lavados com HBSS e as espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS) dosados com DCFH-DA (*dichloro-dihydro-fluorescein diacetate*), uma sonda não fluorescente na região do verde [68] que penetra na matriz intracelular, onde é oxidada a espécies altamente fluorescentes de diclorofluoresceína (DCF). As células foram ressuspensas em DCFH-DA (10 μM ; diluído em PBS), transferidos para uma placa de 96 poços e mantidas a 37 °C durante 30 minutos. Após este período, a fluorescência foi analisada utilizando um leitor de placas com $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}} = 530 \text{ nm}$ (SynergyH1, Leitor híbrido, BioTek, EUA). Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência.

Os neutrófilos tratados com AuNPs foram estimulados com LTB4 (1×10^{-8} M, 1h, 37 °C) e R10. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal anti-

PECAM-1 conjugado ao fluoróforo ficoeritrina (PE) ou com anti-integrina $\beta 2$ conjugado ao fluoróforo fluoresceína isocianato (FITC), a 4 °C. Vinte minutos depois, as células foram analisadas num citômetro de fluxo FACS Canto II. Foram analisados dados de 10.000 eventos e os resultados expressos como média da intensidade de fluorescência.

Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de uma única via de variância (ANOVA) aplicando o teste post-hoc de Tukey implementado no software Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). A significância estatística foi fixada em $P < 0,05$.

1.3.5. ELISA de Nanobioconjugados

Foi inicialmente desenvolvida uma primeira versão do ensaio ELISA adaptado aos nanobioconjugados (NBCs) visando a confirmação da sua funcionalidade, isto é, se os anticorpos ligados às AuNPs continuavam reconhecendo e ligando seus antígenos. O princípio básico utilizado foi a imobilização do antígeno H3.3 [65] no interior dos poços da placa de 96 poços, bloqueio, interação com o AuNP-IgG e lavagem. Neste caso, o monitoramento do resultado foi realizado por densitometria óptica (D.O.) em 520 nm pelo fato das nanopartículas de ouro apresentarem alta absorção neste comprimento de onda (banda plasmônica). Entretanto, a densidade óptica estava limitada a uma fina camada de AuNP-IgGs ligadas à parede interna dos poços como pode-se perceber a olho nu pela nuance rosada, o que inviabilizou sua quantificação pelo leitor de ELISA e por espectrofotometria de reflectância (FieldSpec) como observado na fotografia da **Figura 8**. Assim, o método foi adaptado como descrito abaixo para possibilitar a leitura.

Figura 8: Fotografia dos poços da placa de ELISA ao término do ensaio, onde pode-se perceber a olho nu uma nuance rosada na parede interna dos poços, mas não quantificável espectrofotometricamente.

Primeiramente, foram adicionados 100 μ L de extrato total de *T. cruzi* na concentração de 10 μ g/poço diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,2 M pH 9,5 e incubado por uma noite a 4 °C para propiciar a adsorção do extrato nas paredes internas de cada poço da placa de 96 poços. No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com o tampão PBS-Tween20 0,05%, tomando cuidado para não encostar a extremidade da pipeta nas paredes dos poços, pois isto removeria o antígeno imobilizado. A superfície foi bloqueada incubando-se 200 μ L de solução 5% de caseína (Leite Molico) em PBS por uma hora, a 37 °C. Novamente foram realizadas três lavagens com a mesma solução e cuidados. Em seguida, foram adicionados 100 μ L das amostras contendo os NBCs AuNP-pIgG, AuNP-Fab e AuNP-F(ab')₂ de forma que a concentração em cada poço diminua à metade em relação ao poço anterior até atingir a diluição de 2048 vezes e novamente incubados por uma hora a 37 °C. Esses NBCs foram preparados com correção prévia do pH da suspensão de *cit*-AuNP a 9,5 utilizando uma solução de Na₂CO₃, seguida da centrifugação e ressuspensão em PBS para remover o excesso da biomolécula (livre) e corrigir o pH do meio para favorecer a formação do imunocomplexo. Neste experimento foram usados os anticorpos policlonais (pIgG), pois sabe-se que a

sensibilidade do método é aumentada. Novamente foram realizadas três lavagens com a mesma solução e tomando-se os mesmos cuidados. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução contendo os anticorpos secundários de cabra anti-cadeia leve de anticorpo de coelho (*Thermo*) conjugados com HRP (peroxidase de raiz-forte) e incubados por uma hora a 37 °C. Novamente foram realizadas três lavagens com a mesma solução e tomando-se os mesmos cuidados. Finalmente, foram adicionados 100 µL do substrato TMB e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, protegidos da luz. Em seguida, fez-se a leitura de D.O. em 655 nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata para cada amostra. Dois controles negativos foram realizados, um formado pelo NBC de AuNP-IgG de camundongo anti- α -tubulina que recebeu o mesmo tratamento em todas as etapas, e o outro formado pelo NBC de interesse que recebeu o mesmo tratamento em todas as etapas, exceto na primeira em que a solução utilizada continha somente o tampão carbonato-bicarbonato sem o extrato de *T. cruzi*. O controle positivo foi feito utilizando-se pIgG livre ao invés do NBC.

Além disso, fez-se um ensaio inicial para testar se as AuNPs poderiam estar contribuindo para a D.O. lida em 655 nm e qual seria o agente bloqueador mais adequado para os ensaios. Desta forma, para cada diluição da suspensão de AuNP-IgG, foi realizada a mesma diluição utilizando-se *cit*-AuNPs sem pIgG e testou-se todo experimento com bloqueio de BSA 100 µg/mL em PBS e também de leite Molico desnatado a 5% m/m também em PBS.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. Nanopartículas de Ouro

O material de partida, *cit*-AuNPs, tem um diâmetro médio de ~ 20 nm de acordo com as medidas de DLS, sendo que o raio hidrodinâmico médio aumentou quando as moléculas pequenas de citrato foram substituídas pelas biomoléculas maiores (**Tabela 2**). A concentração de nanopartículas da suspensão-estoque foi estimada em 1×10^{11} partículas/mL (8×10^{-5} g Au/mL) a partir da quantidade de ácido tetracloroáurico utilizada na síntese, bem como do número médio de átomos de ouro nas AuNPs considerando-as esféricas e com diâmetro médio de 20 nm, como determinado por MET (**Figura 9**). Também foi considerada a densidade do ouro de $19,30 \text{ g/cm}^3$ (detalhes na seção 1.3.1.4).

Figura 9: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *cit*-AuNP (A) e AuNP-IgG (B).

Entre os métodos convencionais de síntese de AuNPs por redução de derivados de Au(III), o método de Turkevitch [58] publicado em 1951 tem sido o mais conhecido e utilizado há mais de 60 anos. Este também é conhecido como método do citrato, pois utiliza-o como agente redutor de HAuCl_4 em água produzindo nanopartículas de ouro com diâmetro

médio de cerca de 20 nm. Em 1973, Frens [59] conseguiu obter AuNPs de tamanho controlado entre 16 e 147 nm simplesmente variando a razão entre as concentrações dos agentes redutor e estabilizante (citrato trissódico) e o ouro. Recentemente foi relatada [4] a produção de AuNPs estabilizadas por 3-mercaptopropionato de sódio através da adição simultânea de sal de citrato com um surfactante, onde o tamanho também pode ser controlado pela variação da razão agente estabilizante/ouro.

1.4.1.1. Distribuição do Tamanho por Número e por Intensidade

Analisando-se o aspecto visual (tonalidade e transparência), a largura de banda e comprimento de onda da banda plasmônica no espectro de extinção UV-Vis das suspensões de AuNPs, pode-se inferir o seu tamanho aproximado. Todavia, um resultado mais preciso do tamanho médio e da distribuição de tamanho das nanopartículas presentes em uma dada suspensão pode ser rapidamente obtido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Vale ressaltar que esta técnica mede o diâmetro hidrodinâmico da partícula (para maiores detalhes, ler **Apêndice 1**) e não somente do núcleo de ouro, como é o caso das microscopias eletrônicas.

A distribuição de tamanho segue tipicamente uma distribuição normal na escala logarítmica e que pode ser aproximada por uma função do tipo gaussiana quando a abscissa também se encontra na escala logarítmica (mais detalhes na seção 1.3.2.5). Na **Figura 10A** vemos o histograma de distribuição por número de AuNPs e este apresenta-se monomodal e um pouco estreito (4 a 20 nm). Já o histograma de distribuição por intensidade geralmente apresenta-se mais largo e com o diâmetro médio maior em relação ao por número, principalmente em amostras que contêm partículas com diâmetro médio maior que 10 nm (**Figura 10B**).

Figura 10: Histogramas de distribuição de tamanho (diâmetro, em nanômetros) por (A) número e (B) intensidade de espalhamento das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método do citrato. Cada linha representa uma das cinco corridas efetuadas pelo DLS.

O número de fótons espalhados é proporcional à concentração de partículas, mas a seção de choque para espalhamento de luz aumenta cerca de 10^6 vezes em função do aumento do tamanho das partículas (para maiores explicações, ler **Apêndice 1**). Por isso, a intensidade de espalhamento é maior que o esperado no caso de partículas maiores, podendo levar a conclusões equivocadas se o parâmetro de interesse for o número de partículas. Dentre os tipos de histogramas de distribuição que o equipamento pode calcular, aquele que apresenta maior confiabilidade é o da intensidade, pois os demais (por número, volume ou área) dependem de parâmetros que o usuário precisa fornecer como a intensidade de absorção no comprimento de onda do laser pelas partículas e índice de refração das mesmas, que muitas vezes são incertos ou desconhecidos. Além disso, uma distribuição por intensidade comprova

a existência de partículas maiores ou agregados de partículas que estariam em menor quantidade na amostra, mas que não apareceriam na distribuição por número, por exemplo. É claro que, quanto mais monodispersa for a amostra, mais similares serão os valores de diâmetro médio e o perfil de distribuição entre os diferentes tipos de histogramas de distribuição.

O equipamento apresenta vários ciclos de medidas de curto tempo, o que é interessante para se ter uma ideia mais global e real de como está a amostra e identificar eventuais mudanças de perfil de distribuição de tamanho em função do tempo decorrentes de agregação ou precipitação de agregados maiores.

1.4.1.2. Modificações no Método do Citrato

Amostras com distribuições estreitas de tamanhos, de preferência monodispersas, são importantes para fins de quantificação tanto do número de AuNPs na suspensão quanto do número de moléculas de proteína ancoradas em sua superfície, pois torna possível prever a área superficial total das AuNP em suspensão e a quantidade de biomoléculas necessárias para recobri-las e estabilizá-las. Além disso, o tamanho precisa ser controlado nas aplicações médicas, principalmente se administrado intravenosamente devido ao diâmetro limitado das veias.

As modificações feitas no método de síntese convencional foram introduzidas no sentido de tentar melhorar a distribuição de tamanho. Um dos fatores considerados foi a temperatura da solução de citrato de sódio adicionada à solução de HAuCl_4 , pois esta afeta diretamente a cinética de nucleação e de crescimento das AuNPs. A adição de uma solução à temperatura ambiente diminui consideravelmente a temperatura da mistura reacional. Por isso o efeito do aumento da temperatura dessa solução de citrato sobre a distribuição de tamanho

das AuNPs foi avaliada. Outro fator avaliado foi o efeito da taxa de variação da temperatura da mistura reacional através de refluxo em placa de aquecimento ou micro-ondas.

Os valores de tamanho médio, em nm, das AuNPs sintetizadas pelo método do citrato medidas por DLS em função da intensidade de espalhamento e pelo número de nanopartículas, estão mostrados na **Tabela 2**. Os resultados obtidos refluxando-se a mistura reacional usando placa de aquecimento e com solução de citrato de sódio pré-aquecido a 60 °C, utilizando somente solução de citrato pré-aquecido a 60 °C e micro-ondas como forma de aquecimento em sistema aberto foram listados.

Tabela 2: Os valores de tamanho médio, em nm, das AuNPs dadas por intensidade de espalhamento e por número de nanopartículas sintetizadas pelo método do citrato, mas com as modificações indicadas.

Modificação	Tamanho médio por intensidade (nm)	Tamanho médio por número (nm)
Refluxo e citrato pré- aquecido a 60°C	28,71 (95,4%)	13,60 (100%)
	3861 (4,6%)	
Citrato pré-aquecido a 60°C	20,42 (100%)	13,11 (100%)
Sistema aberto em micro-ondas	42,99 (69,2%)	1,652 (100%)
	2,367 (30,8%)	

O refluxo, após adição de solução de citrato de sódio pré-aquecida a 60 °C, gerou majoritariamente AuNPs de 13,60 nm de diâmetro, distribuição de tamanho monomodal e relativamente larga (7 a 40 nm) pela distribuição por número. Já a distribuição por intensidade apresentou-se bimodal, indicando majoritariamente a presença de nanopartículas de 28,71 nm que correspondem à distribuição de 13,60 nm da distribuição por número, mas também uma pequena quantidade de partículas bastante grandes por volta de 3861 nm, que podem ser

agregados de AuNP gerados durante a síntese ou a presença de contaminantes externos. Assim, essa modificação apresentou resultados similares ao do método convencional, exceto pela ausência das AuNPs de tamanho próximo a 1 nm.

Já os resultados obtidos utilizando apenas solução de citrato de sódio pré-aquecido foram significativamente melhores que no experimento anterior por apresentar uma distribuição monomodal tanto na distribuição por intensidade quanto na por número. Além disso, os tamanhos médios 20,42 e 13,11 nm estão mais próximos e a distribuição mais estreita (8 a 30 nm).

Por outro lado, as suspensões de nanopartículas de ouro preparadas no micro-ondas levaram a nanopartículas com uma distribuição bimodal por intensidade onde majoritariamente tem-se AuNPs muito pequenas com cerca de 1,652 nm, confirmado pela ausência de nanopartículas maiores na distribuição por número. O sinal das partículas maiores que 42,99 nm é maior do que as de 2,367 nm na distribuição por intensidade, mas isso não significa que está em maior quantidade, pois partículas maiores espalham luz mais eficientemente que partículas menores.

Portanto, o melhor método parece ser o baseado somente no pré-aquecimento da solução de citrato de sódio a 60 °C. Isso garante uma diminuição na diferença de temperatura entre a solução do ácido tetracloroáurico e a do citrato e, assim, diminui-se o tempo necessário para atingir a temperatura na qual a cinética de reação do citrato como um redutor se torna suficiente para promover a formação de Au⁰. Dessa forma, o processo de nucleação das partículas ocorre quase de uma única vez, garantindo uma distribuição de tamanho mais estreita.

Foi escolhida a temperatura de 60 °C para evitar a evaporação da água da solução de citrato de sódio, o que aumentaria sua concentração, fator fundamental para controlar o

tamanho das AuNPs como mostrado na próxima seção. Além disso, o citrato torna-se um bom agente redutor somente a partir de 80 °C, temperatura próxima a 60 °C.

Figura 11: Imagem de MET de amostra de suspensão de AuNPs preparada pelo método do citrato modificado com pré-aquecimento da solução de citrato de sódio a 60 °C, preparada por dispersão da suspensão sobre rede de cobre recoberta com filme de carbono e evaporação do solvente a T.A. Ampliação de 200 mil vezes, barra preta corresponde a 50 nm.

A imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrada na **Figura 11** evidencia que as AuNPs sintetizadas usando solução de citrato de sódio pré-aquecida a 60 °C são relativamente regulares e esféricas. Além disso, são estáveis pois sua suspensão permaneceu sem precipitados ou modificação de cor e distribuição de tamanho por DLS praticamente inalterada, por cerca de quatro meses.

1.4.1.3. Variação da Concentração de Citrato de Sódio

Em 1973, Frens [59] publicou um método de preparação de nanopartículas com distribuições de tamanhos relativamente estreitas por meio do controle do processo de nucleação pela relação $[\text{AuCl}_4^-]/[\text{citrato}]$ e a concentração de moléculas protetoras. Sendo assim, foram sintetizadas *cit*-AuNPs de diversos tamanhos através da variação da quantidade relativa de citrato de sódio adicionada ao meio reacional. Essas sínteses foram realizadas com o intuito de se correlacionar o tamanho médio e o perfil de distribuição de tamanho com o

poder redutor do citrato (Sigma), dado pela sua concentração relativa, utilizando-se o método de Turkevich para a síntese das AuNPs.

Para tanto, todas as condições experimentais, exceto a concentração relativa de citrato, foram mantidas constantes. Assim, a solução-estoque foi preparada dissolvendo-se 32,9 mg de HAuCl_4 em 200 mL de água deionizada, aquecida sob agitação constante a 1.150 rpm e mesma taxa de aquecimento da placa de aquecimento. Foram utilizados erlenmeyers de 125 mL para comportar o volume de 50 mL de solução, a mesma barra magnética e 1,5 mL da solução de citrato de sódio foram adicionados com uma micropipeta de 5 mL para promover uma adição rápida e controlada. As soluções de citrato foram preparadas momentos antes da síntese a partir da diluição de uma mesma solução-estoque a 2% m/m. As concentrações das soluções de citrato utilizadas foram 0,5, 1,0 e 1,5% m/m.

Os espectros de extinção e a distribuição de tamanho (DLS) das suspensões sintetizadas e mostradas na **Figura 12** são apresentados, respectivamente, na **Figura 13** e na **Tabela 3** abaixo.

Figura 12: *Fotografia das suspensões de cit-AuNP sintetizadas com diferentes concentrações de citrato: 1.5%, 1.0% e 0.5% (da esquerda para a direita).*

Figura 13: Espectros de extinção das suspensões de cit-AuNP sintetizadas com diferentes concentrações de citrato: 1.5%, 1.0% e 0.5%.

Observando-se os espectros de extinção das suspensões mostradas na **Figura 13**, pode-se perceber que as AuNPs preparadas com concentrações de citrato menores apresentam espectros UV-vis em que a banda plasmônica se desloca para comprimentos de onda maiores (deslocamento batocrômico), ao mesmo tempo que apresenta intensidade e largura à meia-altura maiores.

Tabela 3: Os valores de tamanho médio e de intervalo de distribuição, em nm, das AuNPs determinadas em função da intensidade de espalhamento e do número de nanopartículas. As amostras foram sintetizadas pelo método do citrato variando-se a concentração do mesmo.

Concentração de citrato	Intensidade		Número	
	Tamanho médio (nm)	Intervalo de distribuição (nm)	Tamanho médio (nm)	Intervalo de distribuição (nm)
0,50%	48,50 (98,4%)	10 - 130	28,00 (14,4%)	10 - 100
	5,62 (1,6%)		5,19 (85,6%)	
1,00%	30,80 (100%)	20 - 50	28,29 (100%)	20 - 40
1,50%	20,19 (100%)	15 - 30	18,95 (100%)	15 - 30

Os tamanhos médios e o intervalo de distribuição de tamanho de partícula medidos para as amostras preparadas variando-se a concentração de citrato são mostrados na **Tabela 3**. Aumentando-se a concentração relativa de citrato, há uma diminuição no tamanho médio das

partículas de aproximadamente 50 para 30 e 20 nm de diâmetro, respectivamente, e também uma diminuição no intervalo de distribuição de tamanhos das partículas (perfil de gaussiana).

1.4.1.4. Cálculo da Concentração de AuNPs

Saber a concentração das AuNPs em suspensão é imprescindível, principalmente para estimar a quantidade de biomolécula que deve ser adicionada para garantir o recobrimento total da superfície das partículas e evitar desperdícios. Mas o cálculo não é uma tarefa fácil como acontece com espécies moleculares bem definidas, pois devido a entropia do sistema, toda síntese de nanopartículas resulta numa distribuição de tamanhos, isto é, não existe um tamanho único de partícula, mas uma distribuição do tipo normal em torno de um diâmetro médio. Por isso, não existe nenhum método analítico experimental que possa ser utilizado para medir a concentração real de nanopartículas, sendo necessária a realização de cálculos estatísticos para se ter um valor aproximado dessa quantidade, o que não é algo prático nem simples.

Para contornar esta deficiência, existem aproximações teóricas e experimentais que se baseiam somente no diâmetro médio das partículas para a realização dos cálculos. Essas aproximações estão descritas abaixo.

Aproximação Teórica

Para estimar a concentração teórica das AuNPs na suspensão preparada pelo método do citrato, o volume de uma única nanopartícula esférica foi calculado utilizando-se o diâmetro médio medido, sendo o valor obtido utilizado para calcular a sua massa considerando-se a massa específica do ouro de $19,30 \text{ g/cm}^3$. Assim, o número médio de partículas presentes na suspensão pode ser estimado dividindo-se o número total de átomos de Au(0) gerados na solução pelo número de átomos de Au(0) presentes em cada nanopartícula.

O número total de átomos de Au(0) foi calculado diretamente a partir da quantidade de HAuCl_4 utilizada nas sínteses (cerca de 8 mg em 50 mL de água). Para tanto, supõe-se que todo Au(III) foi reduzido, gerando nanopartículas monodispersas e perfeitamente esféricas.

Segue abaixo o cálculo passo-a-passo, tomando como exemplo nanopartículas de 20 nm de diâmetro (D) preparada partindo-se de uma solução de 16,00 mg de HAuCl_4 (MM = 339,8 g/mol) em 100 mL de água:

$$r = \frac{D}{2} = \frac{20}{2} = 10 \text{ nm}$$

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{4}{3} \pi 10^3 = 4189 \text{ nm}^3 = 4189 \times 10^{-18} \text{ cm}^3$$

$$\text{massa de uma AuNP} = \frac{19,30 \text{ g}}{\text{cm}^3} \times 4189 \times 10^{-18} \text{ cm}^3 = 8,085 \times 10^{-14} \text{ g}$$

$$1 \text{ mol HAuCl}_4 = 1 \text{ mol Au} \Rightarrow \frac{16,00 \text{ mg HAuCl}_4}{339,8 \text{ g/mol}} = \frac{9,276 \text{ mg Au}}{197,0 \text{ g/mol}}$$

$$\frac{9,276 \times 10^{-3} \text{ g}}{8,085 \times 10^{-14} \text{ g}} = 1,147 \times 10^{11} \text{ AuNPs em } 100 \text{ mL} = 1,147 \times 10^{12} \text{ AuNPs/L}$$

$$1,147 \times 10^{12} \text{ AuNPs/L} = 1,905 \times 10^{-12} \text{ mol AuNP/L}$$

Onde r é o raio, D o diâmetro e V o volume da esfera.

Aproximação Empírica

Como as AuNPs são coloridas, apresentam um espectro de extinção UV-Vis característico com uma banda ao redor de 520 nm, cujo máximo depende do tamanho médio das AuNPs em suspensão e da constante dielétrica do meio. Assim, uma forma de determinar experimentalmente sua concentração média em suspensão seria a mesma que se faz com moléculas (cromóforos) usando a equação de Lambert-Beer (eq. 1), segundo a qual a absorvância é uma função linear da concentração segundo a relação abaixo:

$$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad \text{eq. 1}$$

Onde “Abs” se referente à absorvância molar, ε à absorvidade molar, b ao caminho óptico e C à concentração molar do composto. No caso das AuNPs, a absorvidade molar é chamada de coeficiente de extinção (ver seção 1.1.2). Este é característico de cada nanopartícula e cada comprimento de onda, e expressa a probabilidade (seção de choque) de interação de uma dada nanopartícula com a luz incidente.

A metodologia descrita abaixo foi desenvolvida por Liu e colaboradores [69], que simplesmente calcularam o coeficiente de extinção (ε) de *cit*-AuNPs a partir da eq. 1 usando suspensões obtidas a partir da diluição de uma suspensão de *cit*-AuNP de concentração e tamanho conhecidos (concentrações relativas de 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, e 0,2), e os valores de absorvância medidos em 506 nm. Foi observada uma correlação linear entre o logaritmo neperiano dos ε 's com o logaritmo neperiano do diâmetro médio das partículas em suspensão (eq. 2) como mostrada na **Figura 14** abaixo.

$$\ln \varepsilon = 3,32111 \cdot \ln D + 10,80505 \quad \text{eq. 2}$$

onde ϵ é o coeficiente de extinção em $M^{-1}cm^{-1}$ e D é o diâmetro médio do núcleo das nanopartículas. O ajuste linear dos dados experimentais apresentou coeficiente de correlação de 0,997 e desvio padrão de 0,220.

Assim, o gráfico da **Figura 14** (eq. 2) pode ser utilizada como uma curva de calibração para calcular ou estimar a concentração de nanopartículas ou o diâmetro médio de uma amostra de suspensão de nanopartículas, sem a necessidade de fazer medidas de MET ou cálculos mais complicados para fazer uma estimativa.

Figura 14: Regressão linear mostrando a proporcionalidade entre o logaritmo neperiano do coeficiente de extinção e o logaritmo do diâmetro médio do núcleo das nanopartículas de ouro [69].

Embora a teoria de Mie indique que a extinção de fótons devido à ressonância plasmônica de uma nanopartícula também depende da constante dielétrica do meio em torno da mesma, incluindo tanto o solvente quanto o recobrimento pelas moléculas protetoras, estes efeitos não parecem contribuir significativamente sobre o coeficiente de extinção da banda de ressonância plasmônica de superfície.

Por isso, na prática, o coeficiente de extinção (ϵ) é calculado a partir do diâmetro médio (D) das AuNPs medido por alguma técnica experimental como DLS ou microscopia eletrônica, utilizando-se a equação 2 empírica já apresentada. Substituindo-se esse valor na equação 1 de Lambert-Beer apresentada acima e a absorbância medida no espectro de

extinção em 506 nm, pode-se estimar o valor da concentração molar média das nanopartículas.

1.4.2. Nanobioconjugados

1.4.2.1. Caracterização dos Bioconjugados de Ouro

Espectrofotometria UV-Vis, medidas de DLS e de potencial- ζ , e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas para comprovar e caracterizar a formação dos nanobioconjugados (NBCs) de AuNPs.

Independentemente do tipo de interação ou ligação de biomoléculas na superfície das AuNPs, o bioconjugado apresentará um espectro de extinção com pelo menos um pequeno alargamento e deslocamento batocrômico da banda plasmônica em relação ao espectro da *cit*-AuNP, como mostrado na **Figura 15**. Isso acontece devido aos plasmons de superfície da AuNP serem sensíveis à variação de massa e de carga, o que acontece com a aproximação e interação das biomoléculas com a superfície das nanopartículas. Mas essas mudanças espectrais são diferentes daquelas observadas no fenômeno de acoplamento plasmônico devido à agregação das partículas [70]. Neste caso, uma nova banda larga e intensa é observada na faixa de 600-900 nm, dependendo de quão fortemente os plasmons localizados de superfície estão acoplados.

Figura 15: Espectro de extinção UV-Vis das AuNPs conjugadas com anticorpo (IgG), albumina (BSA), proteína A e polietileno glicol de MM 4000.

Figura 16: Representação esquemática do nanobioconjugado mostrando que seu diâmetro corresponde a soma do diâmetro da AuNP (D_{AuNP}) e de duas vezes o diâmetro da biomolécula ($D_{proteína}$).

Em média, todas as sínteses de AuNPs usando solução de citrato de sódio 1% m/m geraram nanopartículas com tamanho médio de ~20 nm e potencial- ζ negativo, como mostrado na **Tabela 4**. Ao ancorar moléculas maiores como proteínas ou polímeros na superfície das mesmas para formar os NBCs, espera-se o aumento de seu raio hidrodinâmico. Teoricamente, seria esperado um tamanho resultante igual a soma do diâmetro do núcleo da

nanopartícula de ouro e de duas vezes o da proteína ou polímero, como esquematizado na **Figura 16** abaixo. Entretanto, o tamanho médio e a distribuição de tamanhos dos NBCs dependem de alguns fatores que podem fazer com que o resultado desvie daquela correlação: 1) estabilidade coloidal dos NBCs formados, pois a agregação deslocará o tamanho médio para tamanhos cada vez maiores provocando um alargamento na curva de distribuição; e 2) organização das biomoléculas e das moléculas de água e dos íons ao redor do núcleo de ouro.

O potencial- ζ também pode ser usado para acompanhar a formação do nanobioconjugado, além de expressar o grau de estabilidade coloidal do mesmo. O potencial- ζ das AuNPs é sempre negativo devido à presença do íon citrato que foi adicionado em excesso no meio reacional e de seus produtos de oxidação que apresentam grupos negativamente carregados, geralmente pela desprotonação de grupos ácido carboxílico. Mas este potencial muda após o ancoramento de outras moléculas em sua superfície, pois, além de substituir o citrato e seus produtos de oxidação por essas outras moléculas, a maioria das biomoléculas e alguns polímeros são eletricamente carregados, como é o caso das proteínas, cuja carga é dependente do pH do meio (ver mais detalhes no **Apêndice 2**). Os NBCs preparados com proteínas apresentaram potencial- ζ mais negativos do que da *cit*-AuNP em si, indicando uma maior estabilidade coloidal do primeiro em comparação com o do segundo. Todavia, uma diminuição (em módulo) de ~60% foi observada no caso do AuNP-PEG4000, o que era esperado devido ao deslocamento de íons citrato da superfície das *cit*-AuNPs pelas cadeias eletricamente neutras de polietileno glicol.

Tabela 4: Tamanho médio (nm) e potencial- ζ das cit-AuNPs e seus bioconjugados medidos pela técnica de DLS.

Partícula	Tamanho* (nm)	Potencial- ζ^* (mV)
<i>cit</i> -AuNP	20.60	-10,4
AuNP-IgG	46.70	-26,4
AuNP-BSA	25.85	-19,7
AuNP-Protein A	27.03	-19,7
AuNP-PEG4000	22.31	-6,47

A estabilização dos NBCs também foi confirmada através das imagens de MET mostradas na **Figura 17**, onde pode-se notar uma diminuição da tendência da aglomeração das AuNPs quando estas estão conjugadas a biomoléculas. Na **Figura 17A** pode-se verificar que as AuNPs recobertas somente com citrato apresentam-se bastante aglomeradas, enquanto que as AuNPs recobertas com as proteínas e PEG (**Figura 17B–F**) tem-se uma distribuição mais uniforme e agregados menores. Isso acontece pelo fato das macromoléculas ligadas à superfície impedirem que as nanopartículas se aproximem por impedimento estérico. Pode-se perceber também manchas claras entre as nanopartículas nas **Figuras 17B–E** que podem ser atribuídas a agregados de proteínas com sais e PEG livre em excesso presente no meio.

Figura 17: Micrografia de MET das (A) cit-AuNPs e de seus bioconjugados (B) AuNP-IgG, (C) AuNP-BSA, (D) AuNP-Proteína A, (E) AuNP-PEG4000 e (F) somente do IgG (proteína).

Fatores que Influenciam a Estabilidade dos Nanobioconjugados

Na dimensão nanométrica, fenômenos de superfície se tornam preponderantes. Desta forma, para garantir que as interações diretas entre as proteínas e as nanopartículas de ouro ocorram de acordo com o esperado, é importante controlar estritamente as condições experimentais utilizadas na preparação dos NBCs. No caso, a estabilidade coloidal é definida principalmente pela qualidade da camada de biomoléculas formada sobre a superfície das nanopartículas. A interação das biomoléculas com a superfície das AuNPs pode ocorrer por dois mecanismos principais: a) a substituição das moléculas de citrato e ligação direta da biomolécula na superfície ou b) interação eletrostática de resíduos de aminoácidos positivamente carregados com a superfície da *cit*-AuNP negativamente carregada. Ambos são

fatores importantes, mas interações mais fortes são esperadas no primeiro caso, levando à formação de bioconjugados mais estáveis.

Outro ponto importante é que ambas, AuNPs e biomoléculas, são ligantes-ponte em potencial. Assim, o grau de recobrimento das *cit*-AuNPs pelas biomoléculas e a ordem de adição dos reagentes é também fundamental para a obtenção de NBCs dispersos e estáveis. As AuNPs foram adicionadas à solução das biomoléculas, sob agitação, para assegurar o recobrimento das AuNPs pelas biomoléculas, e não o contrário, formando o NBC desejado. A ordem de adição dos reagentes modula o processo de automontagem. E, para garantir o recobrimento das AuNPs com proteínas, deve-se adicionar a suspensão da primeira sobre a segunda de maneira que as AuNPs sempre encontrem elevadas concentrações de proteínas livres e se liguem rapidamente às mesmas, recobrando-as totalmente.

O grau de recobrimento foi avaliado controlando-se a proporção de AuNP e biomolécula, sendo fundamental atingir uma condição na qual a superfície da nanopartícula esteja completamente recoberta pelas biomoléculas a fim de obter suspensões coloidais estáveis, como mostrado na **Figura 18**. Esse estudo foi realizado sistematicamente pela adição de 1 mL da suspensão de AuNPs em quantidades crescentes de albumina (de 0,25 até 2,0 μ g), acompanhando visualmente e espectrofotometricamente o resultado das reações.

A mudança da coloração da suspensão é um indicativo rápido, direto e confiável do grau de estabilidade coloidal do NBC formado. Essa coloração é resultante de dois fenômenos: variações de massa e carga alteram a frequência dos plasmons localizados de superfície das AuNPs como explicado no começo desta seção; e a aproximação de duas ou mais AuNPs (agregação) que provoca o fenômeno de acoplamento plasmônico.

Figura 18: Coloração das suspensões de AuNP-BSA obtidas variando-se a concentração de albumina (de 0,25 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$, da esquerda para a direita) em 100 μL de solução onde foi adicionado 1 mL da suspensão de cit-AuNP. A cubeta da extrema direita contém apenas a suspensão de cit-AuNP.

Como 0,2 μg de albumina não são suficientes para recobrir toda a superfície das AuNPs presentes em 1 mL de suspensão, provavelmente uma albumina que já está ligada a um AuNP acaba se ligando a outra AuNP próxima que tem uma área livre (sem proteína) em sua superfície, aproximando, assim, duas AuNPs como mostrado na **Figura 19**, atuando como um ligante-ponte entre as partículas.

Figura 19: Representação esquemática de nanobioconjugados instáveis formado pela ligação de duas nanopartículas de ouro através de uma única biomolécula que se comporta como um ligante-ponte.

Essa aglomeração/aproximação das AuNPs permite o acoplamento plasmônico entre elas, levando ao aparecimento de uma nova banda larga na região de 600-700 nm. Este

processo não é desejável, pois o NBC deve ser totalmente dispersável e gerar dispersões coloidais estáveis. Ou seja, devem ser geradas AuNPs individuais rodeadas por moléculas de albumina (**Figura 20A**). Aumentando gradualmente a concentração relativa de albumina, o recobrimento das partículas pelas moléculas de albumina vai se tornando cada vez mais efetivo, promovendo uma estabilidade coloidal cada vez maior e assim, fazendo com que a coloração se aproxime cada vez mais da coloração avermelhada característica de uma suspensão de nanopartículas isoladas. Na **Figura 20B** pode-se observar a tendência de agregação das partículas num padrão de “colar de pérolas”, sustentando a hipótese de que uma proteína se comporta como uma ponte entre duas nanopartículas.

Figura 20: *Imagens de microscopias eletrônicas de varredura (MEV) de nanopartículas de ouro conjugadas a albumina bovina (A) na condição de recobrimento total da superfície das nanopartículas e (B) abaixo da quantidade necessária.*

O fenômeno de acoplamento plasmônico [71] somente acontece a partir de certa distância limite entre as AuNPs que é regida pelo tamanho das partículas. Assim, partículas maiores se acoplam a distâncias maiores, enquanto que com as menores ocorre o contrário. Mas esse acoplamento sempre causará a diminuição da banda plasmônica por volta de 520 nm

e o aparecimento de uma outra banda na região do vermelho-infravermelho próximo. Assim, caso as nanopartículas estejam suficientemente próximas, ocorre uma mudança rápida e visualmente perceptível da coloração da suspensão, que passa do vermelho-bordô para um roxo-intenso.

Outros fatores que afetam a estabilidade coloidal foram estudados e estão apresentados na seção 1.3.3 em detalhe, sugerindo que também depende do tamanho/conformação da biomolécula, da concentração mínima para recobrir totalmente as nanopartículas e do pH do meio.

Finalmente, o último fator que afeta a estabilidade coloidal do NBC, que já é conhecido, é a força iônica do meio. A agregação pode ser induzida pelo aumento da força iônica, pois esta diminui a repulsão eletrostática entre as nanopartículas. Isso acontece, pois o cátion adicionado será atraído pela carga negativa presente na superfície das *cit*-AuNPs, neutralizando a carga do NBC. No entanto, modificando a superfície dessas partículas com biomoléculas, também pode-se controlar o efeito da força iônica, pois geralmente apresentam impedimento estérico, uma propriedade que é menos influenciada pela força iônica do meio. Assim, as suspensões de bioconjugados de AuNPs podem apresentar estabilidade coloidal maior em meios de maior força iônica como tampões, meio de cultura e sangue. Esta elevada estabilidade coloidal foi confirmada pelo valor de potencial- ζ de sinal negativo dos bioconjugados de AuNP em comparação com *cit*-AuNP como já apresentado na **Tabela 4**.

Durante o processo de interação das *cit*-AuNPs com as biomoléculas, geralmente 100 μ L da solução tamponada por PBS da proteína é adicionado em 1 mL da suspensão aquosa das AuNPs. Assim, a concentração de sais do tampão no final do processo será 10x menor, o que não é ideal para a estabilidade e função das biomoléculas. Mas esta condição é importante para evitar a agregação das *cit*-AuNPs antes das biomoléculas se ligarem a elas. Por isso após a formação do NBC, a suspensão é centrifugada e tipicamente ressuspensa numa solução

tampão de PBS.

Entretanto, as *cit*-AuNPs tendem a se auto-agregarem cada vez mais em função do tempo, um fenômeno natural para sistemas nanométricos meta-estáveis em virtude da elevada energia superficial destes materiais e pelo fato do citrato e seus produtos de oxidação se comportarem como ligantes lábeis para AuNPs. Essa maior labilidade pode ser interpretada em função do caráter “duro-mole” dos átomos/espécies envolvidas na ligação coordenativa. O átomo de ouro é considerado um ácido “mole” e os átomos de oxigênio dos grupos carboxilatos das moléculas de citrato e de seus produtos de oxidação bases “duras”. Assim, se as AuNPs se encontram previamente agregadas na suspensão, a interação com proteínas gerará um agregado ainda maior, que precipitará rapidamente conforme mostrado na **Figura 21**.

Figura 21: Fotografia mostrando o comportamento das suspensões de *cit*-AuNP (esquerda), AuNP-IgG estável (centro) e AuNP-IgG instável (direita).

Entendendo a Ligação entre as AuNPs e as Biomoléculas

A ligação direta entre as AuNPs e as biomoléculas tende a ser fraca, podendo ser considerado um processo de adsorção da biomolécula à superfície da nanopartícula, pois acontece principalmente por dois mecanismos: 1) coordenação através de resíduos de aminoácidos específicos (exceto cisteína que se liga fortemente pelo tiol) ou dos N- e C-terminais (no caso das proteínas), ou 2) por interações eletrostáticas entre a superfície da AuNP carregada negativamente e as aminas protonadas dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície das proteínas, ou ainda, entre os cátions de ouro presentes na

superfície da AuNP com grupos carboxilatos desprotonados das proteínas, dependendo do pH do meio e do pKa de cada grupo. Por isso é importante sempre trabalhar com um excesso de proteína para deslocar o equilíbrio e garantir o recobrimento completo das AuNPs, formando NBCs estáveis.

Uma proteína apresenta diversos resíduos de cisteína, metionina, lisina, histidina e ácido aspártico e glutâmico em sua superfície, que possuem, respectivamente, os grupos funcionais tiol, tioéter, amina, imidazol e carboxilato, capazes de se coordenarem aos átomos de Au(0) ou Au(I) presentes na superfície das nanopartículas. Logo, há muitos potenciais sítios de coordenação numa proteína, possibilitando sua ligação em diferentes orientações sobre a superfície, como mostrado na **Figura 22**.

Figura 22: Representação esquemática dos possíveis modos de ligação de moléculas do anticorpo IgG sobre a superfície de uma nanopartícula de ouro.

O anticorpo (**Figura 23**), também denominado imunoglobulina, é uma proteína glicosilada produzida e excretada pelos linfócitos em resposta à presença de “corpos estranhos” (antígenos) no organismo. É formado por quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas e duas leves, que se ligam através de pontes dissulfeto envolvendo resíduos de cisteínas presentes nessas cadeias. As cadeias pesadas estão ligadas por duas pontes dissulfeto, enquanto a cadeia pesada e a leve estão ligadas apenas por uma ponte dissulfeto. O anticorpo também é dividido em duas porções: uma *Fab* que contém cerca da metade da cadeia pesada e duas cadeias leves que contêm a região variável do anticorpo, e uma *Fc* que

contém a outra metade das duas cadeias pesadas e sítios de ligação para receptores de membrana dos macrófagos, responsáveis por iniciar a resposta imunológica. A região variável é responsável por reconhecer e ligar-se ao antígeno. Os N-terminais de cada cadeia se encontram na parte apical da porção *Fab* e os C-terminais das cadeias pesadas na parte inferior da porção *Fc*.

Assim, como mostrado na **Figura 22**, existe uma probabilidade dos anticorpos se ligarem espontaneamente às AuNPs pela porção *Fab*, onde se encontram os quatro grupos N-terminais das duas cadeias leves e pesadas (**Figura 23**), ou regiões próximas a esse sítio. O problema é que esta porção é responsável pelo reconhecimento e ligação aos antígenos. Logo, a ligação por esse sítio inibiria a formação do imunocomplexo desejado e, assim, a funcionalidade dos respectivos NBCs. Além disso, a ligação com a nanopartícula de ouro pode gerar mudanças conformacionais na proteína levando à perda das propriedades de reconhecimento molecular, por exemplo, do tipo antígeno/anticorpo ou substrato/enzima.

Portanto, idealmente, os anticorpos deveriam ser ancorados pela porção *Fc*, como mostrado na **Figura 24**, através dos C-terminais das cadeias pesadas presentes na extremidade desta porção, de grupos químicos presentes em resíduos de aminoácidos presentes nesta porção capazes de se coordenarem às nanopartículas de ouro ou através de ligantes-ponte que interagem mutuamente com o ouro e especificamente com a porção *Fc*, como é caso da proteína G, proteína A [32] e avidina-biotina [22, 23]. Deste modo, o sítio de interação com o antígeno ficaria voltado para fora e poderia interagir mais prontamente com o epítipo correspondente. Além disso, essa estratégia evitaria as eventuais mudanças conformacionais causadas pela ligação com as nanopartículas de ouro, pois as subunidades *Fc* e *Fab* estão conectadas por resíduos de prolina que impedem a transferência conformacional entre essas subunidades, maximizando a força da ligação antígeno-anticorpo [72]. Por isso, experimentos com a finalidade de maximizar as interações AuNP-IgG de modo a expor as porções *Fab* para

o ambiente circundante foram realizados, seguidos de testes de imunoensaio para verificar a funcionalidade da proteína ancorada na superfície das AuNPs.

Figura 23: Representação esquemática da estrutura quaternária de um anticorpo [73].

Figura 24: Ilustração da formação do imunocomplexo conjugado com uma nanopartícula de ouro formado pela ligação da porção Fc do anticorpo com a superfície do ouro (Au).

1.4.2.2. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mIgG) produzidos pela cultura de hibridomas foram purificados conforme descrito na seção 1.2.2.1. Para verificação do grau de pureza, as

amostras purificadas (frações eluídas) na coluna de purificação por afinidade, a fase livre (sobrenadante) da coluna para verificação daquilo que não interagiu com ela, bem como os padrões de tamanho marcados com *loading buffer* como *low-range*, IgG e albumina foram separados por eletroforese em gel (SDS-PAGE 10%) como mostrado na **Figura 25**.

Figura 25: SDS-PAGE 10% das frações eluídas (poços 4 e 5) e da fase livre da coluna de afinidade Proteína A-sefarose (poços 6 e 7).

Como o gel é redutor devido à presença de β -mercaptoetanol, todas as ligações dissulfeto presentes na proteína serão reduzidas, separando as cadeias previamente ligadas. Nos poços 4 e 5 temos, separadamente, duas frações (I e II) eluídas de duas colunas de afinidade Proteína A-sefarose devido à limitação de volume que estas apresentam (por volta de 10 mL cada). O anticorpo de massa molecular ~ 150 kDa (duas cadeias pesadas de 50 kDa cada e duas leves de 25 kDa cada que estão ligadas previamente por ponte dissulfeto) aparece no gel como duas bandas, uma de 50 kDa (retângulo roxo) referente às cadeias pesadas e outra de 25 kDa (retângulo vermelho) referente às cadeias leves, confirmando que o mIgG interagiu com a resina e foi devidamente eluído. A albumina, proteína adicionada em grande quantidade na cultura celular dos hibridomas, de massa molecular igual a 67 kDa, é o

principal contaminante das amostras purificadas, como mostrado pelas bandas circuladas pelos retângulos verdes. Os poços 6 e 7 evidenciam que existe uma grande quantidade de proteína de peso molecular entre 50 e 90 kDa, aproximadamente, que não interagiu com a resina da coluna de afinidade. Provavelmente essa banda larga corresponde somente à grande quantidade de albumina, não havendo mIgG como indicado pela ausência da banda em 25 kDa.

Essa contaminação provavelmente aconteceu porque o excesso de albumina presente nas amostras proporcionou adsorção inespecífica dessa proteína à resina e à parede da coluna. Por isso, a albumina presente não foi completamente eliminada pela lavagem com PBS após o esvaziamento da coluna preenchida com a fase livre. Por isso, é plausível pensar que, nas condições de eluição (pH 3,0), a albumina adsorvida tenha sido eluída juntamente com o anticorpo desejado. Desta forma, foi realizada uma etapa de deslipidação da fração eluída, como mostrado na próxima seção, na tentativa de eliminar ou reduzir a contaminação por albumina.

1.4.2.3. Anticorpos Policlonais (pIgG)

Após o quarto inóculo do coelho, iniciaram-se os ensaios com os anticorpos policlonais anti-tripomastigota produzidos pelo animal através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), como mostrado na **Figura 26**. Os anticorpos policlonais (pIgG) anti-tripomastigota que reconheciam o antígeno foram marcados com anticorpos secundários contra anticorpos de coelho (anti-coelho) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O título do soro foi estabelecido como sendo aquela diluição em que ainda era possível correlacionar a imagem óptica com a de fluorescência, isto é, era factível delimitar um parasita de outro.

Figura 26: *Imagens das lâminas utilizadas para pesquisa dos anticorpos produzidos pelo coelho através da técnica de imunofluorescência indireta. Imagem de microscopia óptica à esquerda e de fluorescência à direita. O soro do coelho foi diluído 100x em PBS.*

Após o sétimo inóculo, atingiu-se um título maior que 1:4000. Assim, foi realizado na semana seguinte a sangria do coelho, obtendo-se cerca de 35 mL de sangue e a partir deste 15 mL de soro. Todas as etapas de purificação foram realizadas como descrito na seção 1.2.2.2, e após a última diálise, foram obtidos cerca de 50 mg de anticorpo em PBS.

O nível de purificação dos pIgGs foi determinado por SDS-PAGE a 10% tanto das frações eluídas (**Figura 27A**) quanto daquelas que não interagiram com a coluna de afinidade (**Figura 27B**). No primeiro poço encontram-se os padrões de peso-molecular (*low range* - BioRad), seguidos por cinco poços referentes (A) às frações 1 a 5 eluídas da coluna e (B) as cinco frações subsequentes são as respectivas fases livres, de 1 a 5, que não se ligaram à coluna. O último poço do gel A é referente a uma amostra comercial de albumina usada como padrão de concentração, mas pode-se perceber que existem outras proteínas presentes como contaminantes.

Como o gel é redutor, o anticorpo de massa molecular de aproximadamente 150 kDa constituído de duas cadeias pesadas de 50 kDa (linha II) cada e duas leves de 25 kDa (linha III) cada, ligadas por ponte dissulfeto, aparece no gel com essas duas bandas menores. A albumina, proteína mais abundante do sangue e de massa molecular igual a 67 kDa, é o

principal contaminante das amostras purificadas(I). Isso pode ser comprovado no gel B, pois a banda mais intensa (maior quantidade de proteína) é a albumina (linha I). Mas ainda tem anticorpo presente no sobrenadante (linhas II e III), indicando que houve uma saturação da coluna de afinidade proteína A-sefarose. Por isso este foi congelado e armazenado para ser repurificado conforme a necessidade.

Figura 27: SDS-PAGE 10% das frações (A) eluídas e (B) não-ligadas (sobrenadante) à coluna de afinidade Proteína A-sefarose.

Deslipidação dos Anticorpos

Esta iniciativa de deslipidar os anticorpos presentes no soro surgiu ao se observar que as bandas referentes aos pIgGs apresentavam uma longa cauda (arraste) ao invés de serem finas e definidas. Várias glicoproteínas, lipoproteínas e nucleoproteínas podem se ligar de forma irregular com o detergente (SDS), resultando em SDS-poli-peptídeos que migram de forma “anormal” com respeito as suas massas moleculares [74].

Além disso, albumina tem sido um contaminante sempre presente nessas amostras de pIgG purificadas como evidenciado pelos SDS-PAGEs (**Figuras 25 e 27**), talvez por ser a proteína em maior quantidade no sangue e por apresentar a propriedade de se adsorver em superfícies constituídas por diversos tipos de materiais. Assim, por ser uma lipoproteína,

houve uma expectativa desta ser removida juntamente com os lipídeos presentes no soro através do protocolo de deslipidação.

Entretanto, como os sobrenadantes tinham sido submetidos aos processos iniciais de purificação como precipitação com sulfato de amônio 50%, ao adicionar o primeiro reagente do processo (CaCl_2), instantaneamente a solução turvou, indicando a formação de precipitado. Como o sal sulfato de cálcio é pouco solúvel em água, provavelmente as diálises iniciais realizadas logo após a precipitação com sulfato de amônio não tenham sido suficientes e ainda havia sulfato nas amostras contendo anticorpo.

Para tentar confirmar essa hipótese, foi feito o teste que geralmente se usa para identificação de sulfato na amostra. Sobre 500 μL do sobrenadante foram adicionados 100 μL de uma solução de cloreto de bário 0,1 M. Instantaneamente a solução turvou, tornando-se quase leitosa, indicando a precipitação de grande quantidade de sulfato de bário.

Mesmo ocorrendo a formação de precipitado com cloreto de cálcio como mencionado acima, prosseguiu-se com o protocolo de purificação de anticorpo como descrito na seção 1.2.2.2. O SDS-PAGE deste processo de repurificação do sobrenadante da coluna, agora provavelmente deslipidado, está apresentado na **Figura 28**.

Nos poços 3 e 4 temos, respectivamente, pIgG e mIgG, ambos submetidos ao processo de deslipidação. Entretanto, a banda referente à albumina ainda está presente, mas numa quantidade proporcionalmente menor do que na amostra em que o tratamento não foi realizado (**Figuras 25 e 27**). Percebe-se também que nos poços 5 e 6 há uma quantidade ainda muito elevada de albumina, indicando que esta não foi removida no processo como se esperava. Por isso foi necessário refazer mais uma vez a purificação com coluna por afinidade para diminuir ou eliminar essa contaminação com albumina.

Nº do poço	Descrição
1	padrão de tamanho <i>low-range</i>
2	albumina
3	pIgG deslipidado
4	mIgG deslipidado
5	sobrenadante do pIgG
6	sobrenadante do mIgG

Figura 28: SDS-PAGE 10% das frações eluídas (poços 3 e 4) e não-ligadas (sobrenadante) à coluna de afinidade Proteína A-sefarose (poços 5 e 6).

1.4.2.4. Porções *Fab* e *F(ab')₂*

A papaína é uma cisteína-protease da família peptidase C1, de massa molecular 23,406 kDa e pI 8,75, com pH e temperatura ótimos de atividade entre 6,0-7,0 e 65 °C, respectivamente. É formada por uma única cadeia polipeptídica com três pontes dissulfeto e um grupo sulfidrila necessário para sua atividade catalítica. É solúvel em água até 10 mg/mL e tipicamente é ativada através da adição de cisteína-HCl e EDTA, mas sua estabilidade é dependente do pH, havendo uma perda significativa de atividade abaixo de pH 2,8.

Esta enzima é capaz de digerir a maioria dos substratos proteicos mais eficientemente que proteases pancreáticas. Sua ação é relativamente específica e age clivando ligações peptídicas de aminoácidos básicos como leucina ou glicina, mas também pode hidrolisar ésteres e amidas.

Assim, a papaína foi utilizada para clivar os anticorpos em regiões específicas para gerar fragmentos que podem ter uma interação interessante com as AuNPs. Esta cliva numa

região logo abaixo das pontes dissulfeto que unem as cadeias leve e pesada dos IgGs, expondo esses átomos de enxofre que podem se coordenar às nanopartículas de ouro. Desta forma, esses fragmentos devem interagir com a superfície das AuNPs mais fortemente e com a orientação desejada. Assim, espera-se a ocorrência de um processo espontâneo de auto-montagem de NBCs funcionais mais estáveis e menos imunogênicos devido a ausência da porção *Fc*.

Essa reação enzimática cliva os anticorpos gerando um fragmento *Fc* e dois fragmentos *Fab*, que continuam reconhecendo os antígenos com alta especificidade através de sua região variável. Esta clivagem ocorre acima da região da dobradiça (*hinge*) que contém uma ligação dissulfeto, gerando os três fragmentos acima mencionados, os quais podem ser facilmente separados via cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-sefarose.

Segue abaixo (**Figura 29**) uma ilustração dos fragmentos formados a partir da digestão de IgG com papaína e pepsina.

Figura 29: Ilustração dos fragmentos formados a partir da digestão de IgG com papaína e pepsina.

A pepsina pertence à família peptidase A1, é uma protease predominantemente digestiva do suco gástrico de vertebrados. Apresenta massa molecular 34,620 kDa, pI 2,2-3,0 e pH ótimo de atividade entre 1,5-3,5, mas desnatura irreversivelmente acima de pH 8, à

temperatura ambiente. Geralmente, utiliza-se uma solução 0,4% de pepsina em 10 mM de HCl e tempos de digestão de 30 a 90 minutos. Porém, é importante neutralizar a solução após a digestão para evitar desnaturação das proteínas clivadas.

Pepsina é normalmente utilizada para a preparação de fragmentos $F(ab')_2$ a partir de anticorpos através da clivagem da cadeia pesada abaixo da região da dobradiça e das pontes dissulfeto. Com isso, os dois fragmentos Fab permanecem ligados um ao outro preservando a mobilidade dada pela dobradiça, formando uma molécula divalente denominada $F(ab')_2$. Isto é, apresentam dois sítios de interação com os antígenos, conforme esquematizado na **Figura 29**. As cadeias leves são preservadas e continuam ligadas às cadeias pesadas, mas o fragmento Fc é digerido em peptídeos.

Fragmentos Fab e $F(ab')_2$ são usados normalmente em sistemas onde a presença do fragmento Fc pode causar problemas. Em tecidos como linfonodos ou baço e na corrente sanguínea periférica há células receptoras de Fc (macrófagos, monócitos, linfócitos B e células natural killers) que podem se ligar ao fragmento Fc dos anticorpos, causando uma resposta imunológica indesejável na região, sem a presença de um antígeno-alvo. Além disso não conseguem fixar complemento e são capazes de localizar de forma mais exata os antígenos-alvo por serem menores do que os anticorpos.

Nº do poço	Descrição	Nº do poço	Descrição
1	padrão de tamanho <i>low-range</i>	1	padrão de tamanho <i>low-range</i>
2	Albumina bovina	2	Albumina bovina
3	pIgG inteiro de coelho	3	pIgG inteiro de coelho
4	Fab	4	Fab purificada
5	F(ab') ₂	5	Fc + IgG
6*	pIgG inteiro de coelho	6*	pIgG inteiro de coelho
7*	Fab	7*	Fab purificada
8*	F(ab') ₂	8*	Fc + IgG

* amostras que não foram tratadas com β -mercaptoetanol, mas foram desnaturadas com SDS e aquecimento.

Figura 30: SDS-PAGE 12% das frações digeridas com papaína e pepsina imobilizadas. A) frações de Fab e F(ab')₂ após digestão e B) frações de Fab após serem purificadas.

Foi realizado SDS-PAGE 12% com as amostras digeridas e dialisadas, porém não purificadas para, primeiramente, confirmar a eficiência do processo de digestão como mostrado na **Figura 30A**, e após a purificação das amostras contendo *Fab* conforme **Figura 30B**. Além disso, os poços 1 a 5 correspondem às amostras que foram tratadas conforme o procedimento padrão de gel redutor e desnaturante (com β -mercaptoetanol, SDS e mantidas em ebulição por 5 minutos). Nos poços 6 a 8, as amostras foram tratadas como as primeiras, exceto pela adição de β -mercaptoetanol, atribuindo-lhes um caráter não-redutor que mantém as cadeias unidas pelas pontes dissulfeto.

No SDS-PAGE, padrões de proteínas foram utilizadas como referência para um melhor entendimento daquilo que ocorreu nas digestões, tanto na parte A quanto na B da **Figura 30**. No primeiro poço padrões de peso molecular (*low range* - BioRad) de 101, 88, 53, 36, 28 e 19 kDa, no segundo albumina bovina (Sigma) com 67 kDa que sempre aparece como contaminante nas amostras de IgG e no terceiro pIgG de coelho anti-tripomastigota não-digerido (inteiro) que apresenta uma banda em 28 kDa referente à cadeia leve e outra em 56 kDa referente à cadeia pesada.

Nos poços presentes na região redutora do gel da **Figura 30A**, o poço 4 referente ao *Fab* apresentou três bandas, duas mais intensas de cerca de 28 e 31 kDa e outra mais fraca próxima a 56 kDa característica de IgG íntegro, indicando que nem todo anticorpo foi digerido. Provavelmente, este problema pode ser sanado com o aumento do tempo de incubação, pois IgG de coelho é mais resistente à digestão com papaína. Vale ressaltar ainda que nas amostras digeridas com papaína, em géis redutores, os fragmentos *Fab* apresentam duas bandas muito próximas: um fragmento da cadeia pesada de 31 kDa e uma da cadeia leve de 28 kDa, ambas previamente ligadas por pontes dissulfeto. Além disso, as bandas do fragmento *Fc* de ~30 kDa também aparecem em géis redutores (em amostras não purificadas), pelo fato de não serem digeridas pela papaína. O poço 5 referente ao fragmento $F(ab')_2$ apresentou somente uma banda intensa, mas esparsa entre 28 e 35 kDa, indicando que a digestão foi completa (ausência de banda próximo a 56 kDa). Contudo, provavelmente ocorreu a justaposição de algumas bandas de fragmentos de pesos moleculares muito próximos devido aos diversos fragmentos presentes na amostra, como da cadeia leve e da pesada do $F(ab')_2$. E neste caso, não existe banda referente a *Fc*, pois esta foi digerida em pequenas cadeias peptídicas pela pepsina.

Nos poços presentes na região não-redutora do gel da **Figura 30A**, o poço 6 referente ao IgG inteiro (sem separação entre as cadeias polipeptídicas) de coelho, apresentou duas bandas, uma mais intensa próxima a 150 kDa e outra bem mais fraca próxima a 67 kDa, indicando a presença do anticorpo não-digerido (controle) e de contaminação com albumina do sangue do coelho. Provavelmente, uma mesma proteína sob condições não-redutoras não apresentaria a mesma mobilidade eletroforética de amostras preparadas sob condições redutoras, como pode ser verificado nos poços 3 e 6. Pode-se verificar que estes contêm albumina proveniente da contaminação das amostras de IgG de coelho diminuindo a precisão das estimativas dos pesos moleculares das bandas sob condições não redutoras. Por isso, no

poço 7, a banda correspondente ao *Fab* aparece em 48 kDa, sendo que o esperado deveria ser de ~60 kDa. No poço 8 aparece uma banda intensa entre 80 e 110 kDa referente ao fragmento $F(ab')_2$ (110 kDa), além de uma banda fraca por volta de 50 kDa que pode ser *Fab'*, um subproduto da digestão com pepsina[60]. No poço 7 aparece uma banda fraca por volta de 30 kDa, o que não era esperado por ser uma amostra submetida a condições não redutoras.

Nos poços presentes na região redutora do gel da **Figura 30B**, o poço 4 referente ao *Fab* apresentou duas bandas, uma mais intensa próxima a 28 kDa e outra bem mais fraca próxima a 67 kDa, indicando que a purificação removeu efetivamente os IgGs não-digeridos (ausência de banda próxima a 56 kDa). A albumina, assim como o *Fab*, não interagiu com a resina de Proteína A-sefarose como esperado. Por isso as amostras de *Fab* purificadas ainda contém albumina. O poço 5, que corresponde à fração eluída (*Fc* + IgG não-digerido), apresentou aparentemente três bandas, uma próxima a 56 kDa e outra muito clara próxima a 28 kDa, indicando que a fração eluída continha pIgG não-digerida (aparecimento das duas bandas características), e outra intensa em 31 kDa provavelmente referente ao fragmento *Fc*, confirmando a hipótese de separação.

Nos poços 6 e 7 presentes na região não-redutora do gel da **Figura 30B**, aparecem as mesmas bandas descritas na **Figura 30A**. O poço 8 apresentou duas bandas mais intensas, uma por volta de 150 kDa e outra de 120 kDa, respectivamente. Logo, a fração eluída continha IgG não-digerido, talvez pelo tempo da digestão ter sido insuficiente, de modo que contém IgGs que foram parcialmente digeridos ou IgGs não digeridos que tiveram sua mobilidade eletroforética alterada devido à cisteína (reagente utilizado para ativar a papaína) [60]. Entretanto, outras quatro bandas menos intensas também apareceram por volta de 90, 60 e 25 kDa, o que não era esperado por ser uma amostra submetida a condições não redutoras.

Para testar a reatividade dos fragmentos produzidos frente aos antígenos e aos anticorpos secundários anti-coelho conjugado a HRP (Sigma), foi realizado um ensaio

tradicional de ELISA indireto para pesquisa de “anticorpos”. Segue abaixo na **Figura 31**, os gráficos de densidade óptica *versus* o inverso do fator de diluição das amostras de *Fab*, $F(ab')_2$ e IgG de coelho (controle).

Figura 31: Gráficos de densidade óptica (u.a.) versus o inverso do fator de diluição das amostras de *Fab*, $F(ab')_2$ e IgG obtidos da leitura da placa de ELISA a 655 nm.

Os títulos encontrados para as amostras de *Fab*, $F(ab')_2$ e IgG foram, respectivamente, 1:16, 1:128 e 1:256, indicando que ambos os fragmentos são funcionais e que são reconhecidos pelos anticorpos secundários anti-coelho utilizados. Entretanto, o título do *Fab* mostrou-se 15 vezes menor que do IgG (controle positivo), o que não é muito bom. Isso pode ser um indicativo de que, ou ocorreu certo grau de desnaturação do *Fab*, provavelmente causado pelas diversas etapas às quais foi submetido, ou o anticorpo secundário utilizado não reconhece bem o fragmento *Fab*, condição que pode ser facilmente contornada utilizando-se um anticorpo secundário anti-cadeia leve de coelho, como mostrado na seção 1.3.5. do ELISA dos nanobioconjugados.

1.4.2.5. Número de Proteínas por Nanopartícula

Saber o número de proteínas por nanopartícula é fundamental para a produção de nanobioconjugados estáveis, mas não é algo simples de se descobrir devido à inexistência de métodos analíticos que quantifiquem diretamente esse valor. Por isso, existem aproximações empíricas indiretas e teóricas para avaliar o número de proteínas por nanopartícula de ouro como relatado abaixo.

Aproximação Empírica

O teste de agregação das AuNPs é feito há mais de 50 anos [35] e é realizado para avaliar a concentração mínima de moléculas necessária para a conjugação. Para isso, a suspensão de *cit*-AuNP foi ajustada a pH 9 com Na_2CO_3 1,0 M; em seguida, soluções de 50 μL cada e com diferentes concentrações (0 a 50 $\mu\text{g/mL}$) de albumina em água foram preparadas e, sobre estas foram adicionados 450 μL da suspensão de *cit*-AuNPs. Após 5 minutos, 26,3 μL de solução de NaCl 1,0 M foram adicionados para que sua concentração final seja 50 mM. NaCl provoca a agregação das nanopartículas de ouro e desloca a banda plasmônica para regiões acima de 700 nm, como mostrado na **Figura 32** abaixo.

Figura 32: Espectros de extinção dos nanobioconjugados de AuNP-BSA formados em diferentes concentrações de albumina (0 a 50 $\mu\text{g/mL}$), seguidos da adição de NaCl para que sua concentração final seja igual a 50 mM.

Os espectros das AuNPs mostrados na **Figura 32** foram registrados após a adição de concentrações crescentes de albumina e NaCl. Analisando os espectros em função da concentração, percebe-se que o aumento da concentração da biomolécula estabiliza os NBCs, impedindo a agregação induzida pelo sal. Acima de 20 $\mu\text{g/mL}$ de albumina, os espectros correspondentes às suspenções dos NBCs tornam-se cada vez mais semelhantes ao de *cit*-AuNP (linha preta). Portanto, no caso de AuNPs com diâmetro por volta de 30 nm, é necessário adicionar, pelo menos, 2 μg de albumina para estabilizar 10^{11} nanopartículas.

Aproximação Teórica

O problema de Tammes é um problema de empacotamento de um dado número de círculos na superfície de uma esfera, de tal modo que a distância mínima entre os círculos seja maximizada conforme mostrado na **Figura 33**. Este problema foi nomeado após um botânico holandês que colocou o problema em 1930, enquanto estudava a distribuição de poros em grãos de pólen. Este cálculo foi efetuado em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Colli do IME-USP.

Figura 33: Representação do modelo do problema de Tammes que visa maximizar a distância entre os círculos presentes na superfície de uma esfera.

Esse problema de empacotamento foi selecionado para fazer uma aproximação teórica do número de proteínas necessárias para maximizar o recobrimento de uma nanopartícula de

ouro. Além disso, esta aproximação foi adaptada para tentar calcular a quantidade média de proteína para recobrir toda a área superficial das nanopartículas, levando-se em consideração a distribuição de tamanhos das mesmas.

Figura 34: Ajuste do histograma de distribuição de tamanho por intensidade das AuNPs com uma função gaussiana. A) Distribuição em escala linear e B) em escala logarítmica. O histograma apresentado foi previamente corrigido pela raiz sexta para eliminar o fator de espalhamento de luz.

Como partida, uma função de distribuição de tamanho não normalizada em relação ao raio das nanopartículas (R) foi criada (eq. 3). Para tanto, um valor de referência R_0 , por exemplo, o R médio: $R_0 = \frac{25,685}{2} = 12,8$, deve ser criado para, a posteriori, normalizar corretamente a distribuição para que sua integral dê o valor unitário.

Essa função tem como partida uma função gaussiana ajustada a partir de um histograma de distribuição de tamanho por intensidade obtido experimentalmente por DLS como

mostrado na **Figura 34**. Essa gaussiana foi obtida corrigindo os valores originais de intensidade pela raiz sexta para que esta se refira ao “número de partículas” e não ao espalhamento de luz causado pelas mesmas:

$$\left(\frac{12,8425}{R}\right)^6 \cdot \max \left\{ 0, -0,67087 + 14,802 \cdot e^{-\left[\frac{\ln(2R/25,685)}{0,62667}\right]^2} \right\} \quad \text{eq. 3}$$

Como originalmente a distribuição de tamanho depende do diâmetro da nanopartícula e aqui está se trabalhando com o raio da partícula (R), foi colocado “2R” para substituir o diâmetro. O “max” foi escolhido para forçar a distribuição a valer zero onde a função for negativa. Evidentemente, a integral deverá ser feita somente no espaço positivo.

Essa função, dividida por sua integral, define a função distribuição $P(R)$, conforme mostrado na eq. 4 abaixo. A integral na faixa de R=4 a 50 nm, região frequente da distribuição de tamanho dada pelo DLS, corresponde a 1065,8, obtida pelo programa *Wolframalpha*.

$$P(R) = \frac{1}{1065,8} \left(\frac{12,8425}{R}\right)^6 \cdot \left\{ -0,67087 + 14,802 \cdot e^{-\left[\frac{\ln(2R/25,685)}{0,62667}\right]^2} \right\} \quad \text{eq. 4}$$

A partir dos valores tabelados do Problema de Tammes [75], foi possível obter a função $n(r)$. Usando n de 10 a 65, definindo $x = \frac{1}{\sqrt{n}}$, e ajustando $r(x) = ax + bx^2$ pelo Método dos Mínimos Quadrados (MMQ), foi obtido $a = 1,3$ e $b = 7,7$. Isolando x em função de r , temos:

$$x = \frac{1}{\sqrt{n}} = \frac{-a + \sqrt{a^2 + 4br}}{2b}$$

Logo:

$$n(r) = \left(\frac{2b}{\sqrt{a^2 + 4br} - a} \right)^2$$

Assim, o número médio de moléculas de albumina por nanopartícula de ouro poderá ser obtida resolvendo-se a integral abaixo:

$$\int n\left(\frac{r_A}{R}\right) P(R) dR$$

onde r_A é o raio da molécula de albumina. Tomando $r_A = 4$ pelo fato do diâmetro medido pelo DLS da albumina ser cerca de 8 nm e integrando com R de 4 a 50 nm, resulta num valor de 28155,7 que dividido por 1065,8 dá 26,4, isto é, cada nanopartícula carrega, em média, 26 moléculas de albumina. Esse valor é consistente com os valores obtidos experimentalmente como mostrado na **Figura 32**.

1.4.3. Estudo da Estabilidade Coloidal dos Nanobioconjugados

Para melhor compreender os fatores que estão relacionados diretamente com a estabilidade dos nanobioconjugados de ouro (NBCs) como pH, tamanho e pI da proteína, além da proporção AuNP:Proteína, foi realizado um estudo utilizando NBCs produzidos com *cit*-AuNPs de ~18 nm de diâmetro e proteínas de diferentes tamanhos e pontos isoelétricos como anticorpo, albumina bovina, proteína A e lisozima. Essas proteínas foram selecionadas, pois apresentam peso molecular e ponto isoelétrico que variam bastante entre si, de 14,3 a 150 kDa e de 4,9 a 11,3, respectivamente. A proporção AuNP:Proteína foi variada para facilitar a visualização dos efeitos que cada fator (pH, peso molecular e pI, além da quantidade de proteína) exerce sobre a estabilidade coloidal dos NBCs.

Os espectros de extinção dos NBCs formados em cada situação são apresentados nas **Figuras 35 a 38** abaixo. Pode-se perceber nos espectros da **Figura 35** em função do pH (9, 7 e 5), que a partir de determinadas concentrações de IgG, estas passam a ser insuficientes para estabilizar o NBC (diminuição da SPB e surgimento da banda de acoplamento plasmônico acima de 600 nm). Assim, foram respectivamente necessários 40, 50 e acima de 60 µg/mL de IgG para estabilizar o nanoconjugado, indicando que a estabilidade do NBC diminui com o pH. Observando-se da mesma forma, na **Figura 36** as concentrações necessárias de BSA para estabilizar os NBCs são 20, 20 e acima de 60 µg/mL para pH 9, 7 e 5, respectivamente. Na **Figura 37**, 20 µg/mL de proteína A são suficientes para estabilizar o NBC nos três pHs estudados. Já na **Figura 38**, em nenhuma das concentrações de lisozima e em nenhum pH estudado tem-se um NBC estável.

A explicação para isso está na relação “pH do meio” *versus* “pI da proteína”. Quando o pH do meio encontra-se abaixo do pI respectivo da proteína (BSA < proteína A < IgG < lisozima), o NBC formado é instável como claramente pode ser observado no caso da lisozima (**Figura 38**). Isso indica que quando o pH do meio encontra-se acima do pI da proteína, o NBC permanece estável. Isto é, acima do pI da proteína, esta apresenta-se com carga líquida negativa, o que parece favorecer a estabilidade coloidal. Provavelmente, quando a proteína apresenta mais carga positiva, esta neutraliza a carga negativa das *cit*-AuNPs ao interagirem, formando um NBC de carga menos negativa ou até neutra, o que não é interessante, pois a presença de cargas de mesmo sinal na superfície provoca repulsão eletrostática entre as partículas, como discutido na seção 1.1.2.

Outra observação que pode ser feita é o efeito que o tamanho da proteína tem sobre a estabilidade do NBC. Observando os espectros da albumina (67 kDa, pI 4,9) na **Figura 36** e da proteína A (44 kDa, pI 5,1) na **Figura 37**, percebe-se que a segunda apresenta maior estabilidade coloidal que a primeira, apesar de ambas apresentarem pI muito próximos.

Assim, essa diferença de comportamento deve estar correlacionada com o tamanho que essas proteínas apresentam. Como a proteína A é menor, numa determinada concentração (por exemplo, 30 $\mu\text{g/mL}$), a quantidade de moléculas de proteína A será maior que de albumina nesta mesma concentração, indicando que aumentando-se a concentração de proteína, aumenta-se a estabilidade do NBC. Essa propriedade está bem descrita na seção 1.3.2.1, onde discute-se a hipótese de que quando a quantidade de proteína está abaixo da quantidade necessária para recobrir toda a superfície das AuNPs, as proteínas atuam como ligante-ponte, ligando duas ou mais nanopartículas e promovendo o acoplamento plasmônico. Mas é claro que esse aumento da concentração de proteína não aumentará indefinidamente a estabilidade coloidal do NBC, sendo o limite alcançado quando todas as AuNPs estiverem recobertas pelas moléculas da proteína.

Figura 35: Espectros de extinção dos nanobioconjugados AuNP-Anticorpo formados em pH 5, 7 ou 9, variando-se a concentração de anticorpo (IgG) de 20 a 60 µg/mL.

Figura 36: Espectros de extinção dos nanobioconjugados AuNP-Albumina formados em pH 5, 7 ou 9 em função da concentração de albumina (BSA) de 20 a 60 µg/mL.

Figura 37: Espectros de extinção dos nanobioconjugados AuNP-Proteína A formados em pH 5, 7 ou 9 em função da concentração de proteína A (ProtA) de 20 a 60 µg/mL.

Figura 38: Espectros de extinção dos nanobioconjugados AuNP-Lisozima formados em pH 5, 7 ou 9 em função da concentração de lisozima (Lis) de 20 a 60 $\mu\text{g/mL}$.

1.4.4. Toxicidade Hematológica e Microvascular *In vivo* e *In vitro* de AuNP e de Seus Bioconjugados

Toxicidade In Vitro em Células Humanas do Sistema Vascular

A grande maioria das aplicações de nanopartículas em teragnóstica usa a via parenteral (intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, etc.) como rota de administração, sendo a intravenosa (i.v.) a mais comumente utilizada. Quando nanopartículas são injetadas, entram em contato com milhares de componentes presentes no sangue, tanto das células quanto do plasma, além do endotélio de revestimento interno das veias. As células presentes no sangue são divididas em duas categorias: leucócitos circulantes e eritrócitos, sendo a primeira ainda dividida em células mononucleares (PBMC) - monócitos e linfócitos - e polimorfonucleares (PMN) que correspondem aos neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Por isso este estudo de toxicidade vascular buscou verificar o efeito das *cit*-AuNPs e de seus bioconjugados sobre essas classes de células.

Com este estudo, foi mostrado pela primeira vez o comportamento *in vitro* e *in vivo* de bioconjugados de AuNP no sistema vascular, demonstrando que a sua interação com as células do sangue e das paredes dos vasos sanguíneos não provoca morte celular. Ao contrário, verificou-se que evoca efeitos anti-inflamatórios através da redução das interações leucócito-endotélio e da locomoção de neutrófilos para o tecido. Por isso, os dados aqui apresentados contribuem para a ampliação do conhecimento sobre bioconjugados de AuNP visando o desenvolvimento de NBCs para aplicações clínicas.

As *cit*-AuNPs e seus bioconjugados seriam tóxicos se fossem capazes de romper a membrana plasmática dos leucócitos circulantes ou dos eritrócitos. Por isso um primeiro ensaio foi realizado para verificar a viabilidade celular dos leucócitos incubados com essas nanopartículas usando o teste de exclusão por azul de tripano (**Figura 39**). No entanto, as *cit*-AuNPs e seus bioconjugados não causaram rompimento (lise) da membrana, e mais de 95% das PBMC e cerca de 80% das células PMN continuaram viáveis. Além disso, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre células tratadas com R10 e AuNPs.

Figura 39: Viabilidade de células PBMC (A) e PMN (B) avaliadas por teste de exclusão por azul de tripiano, após incubação por 18 h com R10 (controle), cit-AuNP, AuNP conjugada com BSA, IgG, proteína A ou PEG4000. PBMC e PMN foram isoladas de quatro e cinco voluntários sadios do sexo masculino. Não foi verificada qualquer diferença estatisticamente significativa.

Figura 40: Viabilidade de células PBMC (A) e PMN (B) avaliadas por citometria de fluxo, após incubação por 18 horas com R10 (controle) e somente com as moléculas funcionalizantes (BSA, IgG, proteína A ou PEG4000). PBMC e PMN foram isoladas de dois voluntários sadios do sexo masculino. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles.

No entanto, um composto pode induzir morte celular por diversos outros mecanismos que não estão diretamente relacionados com o rompimento da membrana celular em si. Mas como consequência, este pode ter alguma ação que acaba por induzir a morte celular por um dos dois mecanismos principais: apoptose e necrose. A necrose é um mecanismo de morte não controlada induzida por fatores físico-químicos. Por outro lado, a apoptose é um tipo de

morte celular “programada”, onde, em termos gerais, a célula diante de uma condição física, química ou biológica não adequada programa sua própria morte de maneira mais controlada, geralmente não causando uma inflamação crítica no tecido ao seu redor. Por isso, para investigar se as nanopartículas estão causando algum tipo de morte celular, ensaios de apoptose e de necrose celular foram realizados por citometria em fluxo para a verificação da citotoxicidade das AuNPs em células PBMC e PMN. Os resultados mostraram que a percentagem de necrose, apoptose, e apoptose tardia (**Tabela 5**) são muito baixas e indistinguíveis estatisticamente dos respectivos controles. O mesmo experimento também foi realizado para verificar a influência somente das moléculas/biomoléculas usadas para funcionalizar a superfície das AuNPs (**Figura 40**). Todavia novamente nenhum efeito estatisticamente significativo foi encontrado, indicando que nem as moléculas funcionalizantes nem as nanopartículas são capazes de induzir morte celular.

Diante da ausência de toxicidade das nanopartículas, levantou-se a hipótese de que a coroa formada pelas proteínas e outros constituintes do soro fetal bovino (SFB) presentes nos meios de cultura poderia estar “bloqueando” a ação tóxica das *cit*-AuNPs e de seus bioconjugados, já que é sabido que o efeito coroa se manifesta sobre toda nanopartícula posta em contato com meios biológicos [76]. Por exemplo, após a administração intravenosa de um nanomaterial, o sangue é o primeiro meio fisiológico com que tem contato. O plasma sanguíneo contém mais de 1000 proteínas diferentes e com 10^{12} ordens de diferença de magnitude nas suas concentrações [77]. Além das proteínas, lipídeos também estão disponíveis no plasma sanguíneo em quantidade considerável. Portanto, após a injeção de nanopartículas na corrente sanguínea, existe uma competição entre diferentes biomoléculas pelos sítios de interação/adsorção disponíveis na superfície das nanopartículas, seja por forças intermoleculares, covalentes ou eletrostáticas entre os grupos químicos presentes na superfície das biomoléculas e das nanopartículas. Na fase inicial, as proteínas mais abundantes são

adsorvidas sobre a superfície (produto cinético). No entanto, ao longo do tempo, elas são substituídas por proteínas de maior afinidade (produto termodinâmico). Este fenômeno é conhecido como efeito Vroman [78].

Por isso, foi feito um teste-controle a fim de investigar os possíveis efeitos que o soro presente no meio de cultura poderia ter sobre a resposta de citotoxicidade que as AuNPs estavam apresentando frente às células. Foi realizado um ensaio de viabilidade celular por teste de exclusão de azul de tripano, onde células PBMC e PMN (1×10^6 células/poço) foram incubadas durante 18 horas a 37 °C com *cit*-AuNPs na presença ou ausência de 10% de soro fetal bovino (FBS) no meio de cultura (RPMI). Porém, nenhum efeito estatisticamente significativo foi observado como mostrado na **Figura 41**.

Outra maneira de verificar os efeitos citotóxicos causados pelas NPs é através da indução da resposta imunológica nos leucócitos. Esses reagem produzindo diversos compostos envolvidos na sinalização e no recrutamento celular, ativação de complemento e até mesmo de substâncias capazes de eliminar agentes infecciosos. Dentre milhares de moléculas produzidas pelos leucócitos, o óxido nítrico (NO) e o fator de necrose tumoral (TNF) são importantes na sinalização celular da resposta imunológica, atuando direta ou indiretamente na morte celular de microrganismos e tumores. A quantidade de NO produzida e secretada pelos leucócitos no sobrenadante da cultura celular não é medida diretamente, mas através de seu produto de reação mais estável, o íon nitrito. O NO tem meia-vida muito curta, por isso reage prontamente com gás oxigênio e água, formando o ácido nitroso. A quantidade de NO produzida pelas células PBMC e PMN mostrou-se alterada em relação ao controle (R10). Foi observado um pequeno aumento do nível após a incubação com *cit*-AuNP em ambas as células, e com AuNP-BSA e AuNP-PEG4000 nas células PMN. No entanto, essas diferenças foram menores do que 5 μ M, e, provavelmente, não estão relacionadas com qualquer efeito tóxico. Além disso, foi verificado que as AuNPs e seus bioconjugados não

alteraram as vias intracelulares envolvidas na secreção do TNF em células PBMC ou PMN, de tal modo que seus níveis foram equivalentes aos dos respectivos controles (**Figura 42**).

Figura 41: Ensaio de viabilidade celular por teste de exclusão com azul de tripano foi realizado com células PBMC (A) e PMN (B) incubadas com cit-AuNP durante 18h para avaliar a influência de soro fetal bovino presente no meio de cultura RPMI sobre resposta de viabilidade celular. Suspensão celular contendo ou não soro foi usada como controle. Células PBMC e PMN foram isoladas de três e cinco doadores saudáveis do sexo masculino, respectivamente. Não foi verificada qualquer diferença estatisticamente significativa em relação aos controles.

Figura 42: Efeito das cit-AuNP e de seus bioconjugados sobre a secreção de TNF e nitrito pelas células humanas de PBMC (A) e PMN (B). As células foram incubadas durante 18 horas com R10 (controle), cit-AuNP e seus NBCs com BSA, IgG, Proteína A ou PEG4000. Os níveis de TNF e NO_2^- presentes nos sobrenadantes das culturas celulares foram medidos, respectivamente, por ELISA e utilizando-se a reação de Griess. Células PMN e PBMC foram isoladas de cinco doadores saudáveis do sexo masculino. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ vs. R10.

O método mais utilizado para determinação de nitrito em solução é através da reação de Griess [79] baseado na reação de nitrito com sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa, de acordo com a reação apresentada na **Figura 43**, e a concentração de nitrito pode ser determinada espectrofotometricamente. A reação é controlada pelo tempo, por isso o produto deve ser determinado entre 10 minutos e 2 horas após a mistura dos reagentes. É importante realizar as medidas de todas as amostras no mesmo intervalo de tempo para minimizar erros.

Figura 43: Esquema mostrando a reação de Griess comumente utilizada para dosagem de nitrito em solução.

As células endoteliais que revestem as paredes dos vasos, assim como os leucócitos circulantes e os eritrócitos, estão em contato direto com os compostos que circulam nos vasos

sanguíneos, como é o caso de compostos administrados via i.v.. Por isso, o mesmo ensaio de viabilidade celular foi realizado com células HUVEC incubadas com *cit*-AuNPs e seus bioconjugados. No entanto, nenhum composto causou efeito citotóxico nas HUVECs, como confirmado pela ausência de apoptose ou necrose (**Tabela 5**).

Tabela 5: Efeito de bioconjugados de AuNPs sobre a citotoxicidade. Porcentagem de células PBMC, PMN e HUVEC viáveis, apoptóticas, apoptóticas tardias e necróticas após 18 horas de incubação com R10 (controle) ou bioconjugados de AuNP.

		Viabilidade (%)	Apoptose (%)	Apoptose Tardia (%)	Necrose (%)
PBMC*	R10	91.48±1.85	0.78 ±0.42	1.23±0.68	6.52±2.52
	cit-AuNP	88.18±6.32	0.47±0.34	0.98±0.76	10.37±6.80
	AuNP-IgG	90.45±1.88	0.97±0.54	1.66±0.92	6.91±2.75
	AuNP-BSA	90.53±3.55	0.72±0.60	1.08±0.88	7.67±3.98
	AuNP-Protein A	93.27±0.55	1.15±0.55	1.64±0.94	3.97±0.99
	AuNP-PEG4000	92.43±1.02	0.49±0.29	0.84±0.47	6.22±1.29
PMN**	R10	87.73±3.41	7.06±5.20	0.58±0.34	4.66±1.61
	cit-AuNP	85.23±6.04	8.35±6.67	2.44±2.26	4.00±0.69
	AuNP-IgG	88.38±3.76	7.08±5.66	0.73±0.50	3.81±1.00
	AuNP-BSA	88.65±3.25	4.02±2.55	1.72±1.47	5.62±1.32
	AuNP-Protein A	86.05±2.33	5.79±3.32	1.61±0.88	6.55±0.66
	AuNP-PEG4000	90.70±1.09	4.03±2.17	0.71±0.29	4.56±0.77
HUVEC***	R10	86.84±3.59	0.45±0.40	2.39±2.01	11.46±3.50
	cit-AuNP	85.77±5.54	0.48±0.43	3.87±3.52	9.16±2.72
	AuNP-IgG	88.26±3.43	0.33±0.27	1.69±1.40	9.86±2.38
	AuNP-BSA	89.39±2.79	0.11±0.10	0.38±0.09	9.22±2.01
	AuNP-Protein A	89.70±2.57	0.05±0.03	0.20±0.05	5.19±0.43
	AuNP-PEG4000	92.00±1.10	0.03±0.00	0.28±0.23	6.39±0.98

* PBMC foram isoladas de quatro voluntários sadios do sexo masculino

** PMN foram isoladas de cinco voluntários sadios do sexo masculino

*** Solução de 10% de DMSO foi utilizada como controle positivo de morte celular. As células HUVEC de três culturas independentes foram utilizadas no ensaio.

É importante ressaltar que não foram observados efeitos tóxicos agudos, mesmo quando as nanopartículas interagiram e foram internalizadas pelas células PBMC e PMN. As **Figuras 44A e 44B** mostram que ambos os leucócitos circulantes humanos contêm vesículas, provavelmente endossomos, com nanopartículas em seu interior, formando aglomerados de

formas e tamanhos variáveis, após incubação com *cit*-AuNP durante 18 horas. Do mesmo modo, foram encontrados agregados de AuNPs em vesículas no citoplasma de neutrófilos de rato e de HUVECs (**Figura 44C**), como pode ser confirmado pelos espectros de extinção das respectivas regiões selecionadas na **Figura 44C** mostrados na **Figura 44D**, onde aparecem as bandas de ressonância plasmônica características das AuNPs com máximos em 550 nm (nanopartícula isolada) e 700 nm (acoplamento plasmônico devido à agregação das mesmas).

Figura 44: Imagens representativas de células humanas de PBMC e PMN, neutrófilos de ratos e HUVEC incubadas com *cit*-AuNP por 18h. (A) Imagens de MET de uma célula PMN (em cima) e PBMC (embaixo). (B) Imagens ampliadas das regiões em destaque das figuras em (A). (C) Imagens de neutrófilos de rato (em cima) e HUVEC (embaixo) obtidas no microscópio CytoViva. (D) Espectro de extinção das AuNPs selecionadas na figura (C) onde aparecem como pontos brilhantes.

Figura 45: Atividade hemolítica da *cit*-AuNP e de seus NBCs em eritrócitos humanos incubados por uma hora. Triton X-100 foi usado como controle positivo (100%) de hemólise. O sangue foi coletado

*de três doadores sadios do sexo masculino. A atividade hemolítica foi medida espectrofotometricamente em 540 nm. *** $P < 0,001$.*

Para finalizar os ensaios de toxicidade hematológica, foi verificada a atividade hemolítica das *cit*-AuNPs e de seus bioconjugados após a incubação com eritrócitos humanos. Como controle, foi realizado o mesmo ensaio somente com as respectivas moléculas funcionalizantes. A atividade hemolítica em todos os casos foi considerada insignificante por permanecer abaixo de 1%, como mostrado na **Figura 45**. Triton X-100 foi utilizado como controle positivo de hemólise e como parâmetro para normalização (100%) de atividade hemolítica. Neste contexto, He e colaboradores [80] mostraram que AuNPs modificadas com polietileno glicol também não causaram hemólise apesar de acelerarem o processo de senescência dos eritrócitos.

Após injeção i.v., as AuNPs interagiram com as células do sangue e das paredes do vaso sanguíneo. Os leucócitos circulantes e os eritrócitos, bem como as células endoteliais que revestem as paredes dos vasos, apresentam atividades funcionais e metabólicas elevadas, que são fundamentais para a homeostase e a defesa do hospedeiro. Além disso, alterações na expressão/atividade da membrana celular ou de receptores intracelulares, tanto para mais como para menos em relação ao ideal para a regulação das vias metabólicas intracelulares, pode conduzir a várias doenças imunes, vasculares e hematológicas [81]. Entretanto, nossos dados mostram claramente que os NBCs de AuNP não causam apoptose ou necrose em leucócitos humanos e nas células endoteliais, não altera a capacidade das células PBMC e PMN em secretar TNF- α ou NO. Hemólise também não foi observada. A ausência de toxicidade não implica na falta de interação dos NBCs com as células, uma vez que nanopartículas de ouro foram encontradas no citoplasma das células HUVEC, PBMC e PMN. Em resumo, nossos dados sugerem que os NBCs de AuNP podem ser biocompatíveis com as

células sanguíneas, no entanto parâmetros funcionais e morfológicas ainda devem ser analisados para confirmar a ausência de citotoxicidade.

Alterações no Sistema Microvascular In Vivo

Considerando que as *cit*-AuNPs e seus bioconjugados não exibiram efeitos tóxicos agudos em todos os ensaios *in vitro* descritos acima, um ensaio *in vivo* bastante sensível foi escolhido como teste definitivo de toxicidade vascular. Estudos de microscopia intravital foram realizados para avaliar o efeito das AuNPs sobre a hemodinâmica da microcirculação de vasos no mesentério de ratos. Os ensaios foram realizados apenas com *cit*-AuNP, AuNP-IgG e seus controles específicos, a fim de minimizar o número de animais sacrificados.

A injeção de AuNPs não causou alteração na velocidade do fluxo sanguíneo (**Figura 46A**), não aumentou o número de micro-hemorragias (**Figura 46B**) e não induziu a formação de trombos, em comparação com solução salina (controle), durante duas horas de observação.

Figura 46: *Gráficos da cinética de variação da velocidade do fluxo sanguíneo (A) e do número de micro-hemorragias (B) em vênulas mesentéricas (15 a 40 μm de diâmetro) de ratos machos Wistar antes e após tratamento com solução salina, água deionizada, IgG em água deionizada, AuNP-IgG ou cit-AuNP. Os dados representam uma medida qualitativa da velocidade do fluxo sanguíneo, onde os valores foram considerados zero quando não houver alteração nas velocidades após a injeção, um para velocidade diminuída e dois para parada de fluxo sanguíneo. O efeito das nanopartículas sobre o número de micro-hemorragias foi quantificado para contagem desses eventos num campo de 35.000 μm^2 . Os dados foram coletados antes e imediatamente depois da injeção a cada 30 minutos por até duas horas. O número de animais usados em cada grupo foi de 4 a 7. Não foram observadas mudanças estatisticamente significativas em relação aos respectivos controles.*

Por outro lado, a injeção i.v. de água deionizada aumenta o número de leucócitos aderidos nas paredes internas dos vasos e migrados para os tecidos subjacentes aos vasos duas horas depois de sua injeção, como mostrado na **Figura 47A e 47B**, respectivamente. Curiosamente, a injeção de cit-AuNP e AuNP-IgG, ambas dispersas em água deionizada, não causou o mesmo efeito. De fato, o número de células aderidas e migradas nos animais tratados com AuNP foi menor que a obtida em animais tratados com solução salina (**Figuras 47A e 47B**). Isto indica que AuNPs, em especial AuNP-IgG, reduziram as interações leucócito-endotélio, sugerindo uma possível propriedade anti-inflamatória. A **Figura 47C** apresenta imagens representativas do leito vascular mesentérico obtidas com o microscópio intravascular no modo óptico duas horas após cada tratamento. Nitidamente, pode-se perceber diferenças no comportamento leucocitário, indicado pelas setas pretas.

Figura 47: Efeito das cit-AuNPs e AuNP-IgG sobre as interações leucócito-endotélio avaliadas na microcirculação mesentérica de ratos Wistar machos por microscopia intravital. Número de leucócitos (A) aderidos e (B) migrados ao longo das paredes dos vasos mesentéricos antes e 0,5-2h após o tratamento. (C) Imagem representativa do leito vascular mesentérico após os tratamentos. Setas pretas indicam leucócitos aderidos e migrados. Barra preta = 20 µm. Os valores expressam a média dos dados obtidos de 4 a 7 animais de cada grupo. * $P < 0,05$ vs. respectivo tratamento salino; # $P < 0,05$ vs. respectivo tratamento com água.

Diante da hipótese de possível atividade anti-inflamatória das AuNPs, um outro conjunto de ensaios foi realizado para avaliar a relevância de AuNP-IgG nas interações leucócito-endotélio evocadas por um estímulo inflamatório. A aplicação tópica de leucotrieno B4 (LTB4) na região mesentérica induziu uma estimulação local caracterizado pela adesão de leucócitos às paredes dos vasos na região. Mas esse efeito foi suprimido através de injeção prévia de AuNP-IgG, como mostrado na **Figuras 48A e B**.

Figura 48: Efeito de AuNP-IgG sobre a interação leucócito-endotélio suscitado pelo LTB4 in vivo. Número de (A) leucócitos aderidos ao longo das paredes dos vasos mesentéricos de ratos Wistar machos tratados i.v. previamente com solução salina ou AuNP-IgG e subsequentemente (30 minutos) estimulados com LTB4 (10^{-8} M; aplicação tópica sobre a região do mesentério). (B) Imagem representativa dos leitos vasculares mesentéricos. As setas pretas indicam leucócitos aderidos 20 minutos após a aplicação de LTB4. Barra preta = 20 μ m. Os valores expressam a média dos dados obtidos de 4 a 6 animais de cada grupo. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. respectivo tratamento salino; # $P < 0,05$ vs. solução salina no respectivo tempo.

Mecanismo de Ação Anti-Inflamatória das AuNP-IgG

Para esclarecer o mecanismo da atividade anti-inflamatória das AuNP-IgG, a expressão de moléculas de adesão, a quimiotaxia e o estresse oxidativo foram avaliados em neutrófilos tratados com as nanopartículas.

O tratamento com LTB₄ aumentou a expressão de PECAM-1 (e β 2-integrina) em membranas de neutrófilos após 1h de incubação como controle do experimento, mas esta sobre-expressão foi evitada após o tratamento com AuNP-IgG (**Figuras 49A e B**). O tratamento com AuNP-IgG também inibiu a quimiotaxia de neutrófilos induzida por LTB₄ e a produção de ROS (**Figuras 49C e D**) induzida por PMA.

Figura 49: Efeito de AuNP-IgG sobre as funções inflamatórias de neutrófilos. Os neutrófilos de rato foram incubados com R10 ou AuNP-IgG por 2h: (A) B2-integrina, (B) expressão de PECAM, (C) atividade quimiotática e (D) geração de ROS. Os dados expressam a média $\pm$ d.p.m. de células coletadas de 4 animais. ** $P < 0,01$ vc. R10-Basal. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ vc. respectivo R10 + PMA ou R10 + LTB₄.

Apesar de ensaios *in vitro* serem extensamente utilizados para avaliar a toxicidade de substâncias químicas, experimentos *in vivo* contribuem fortemente para esclarecer os efeitos tóxicos, pois são baseados em modelos mais complexos que se aproximam da situação real. Note que a interação das AuNPs com todos os componentes do sangue e as suas propriedades reológicas, assim como os efeitos complexos sobre as células endoteliais da parede dos vasos, poderia causar efeitos tóxicos. Por isso, nossos estudos foram traduzidos para um modelo de rato para investigar a dinâmica de AuNPs *in vivo* na microcirculação desses animais por microscopia intravital através da administração intravenosa de *cit*-AuNP e AuNP-IgG. Os resultados confirmaram a ausência de toxicidade, hemólise, micro-hemorragias ou a formação de trombos *in vivo*. No entanto, essas AuNPs reduziram significativamente as interações leucócito-endotélio, como quantificado pela redução do número de leucócitos aderidos em vênulas pós-capilares e migrados para os tecidos adjacentes. Como a interação leucócito-endotélio é um dos fenômenos iniciais e fundamentais para o desenvolvimento de processos inflamatórios [82], pode-se inferir que os bioconjugados de AuNP afetam direta- ou indiretamente a ligação dos leucócitos às paredes dos vasos durante as fases iniciais do processo de inflamação. Portanto, o mediador pró-inflamatório LTB₄, um produto da via da 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, foi a ferramenta empregada para causar inflamação dependente do tempo que está relacionada à adesão de leucócitos às paredes dos vasos e na migração para os tecidos adjacentes. Interessantemente, o pré-tratamento com AuNP-IgG revogou a adesão de leucócitos ao vaso sanguíneo, confirmando os efeitos anti-inflamatórios no nosso modelo *in vivo*.

A interação dos leucócitos circulantes com as paredes dos vasos é mediada pela ligação de receptores de membrana expressos tanto nos leucócitos quanto no endotélio, denominadas moléculas de adesão [82]. Por conseguinte, as AuNPs devem estar mudando a afinidade dessa ligação com a membrana ou inibindo os mecanismos intracelulares responsáveis pela adesão

celular . Os resultados indicaram que a última hipótese pode ser a mais plausível, tendo-se em vista que AuNP-IgG foram encontrados no citoplasma de neutrófilos de rato uma hora após a incubação. Além disso, a incubação prévia de neutrófilos com AuNP-IgG inibiu a locomoção orientada de neutrófilos induzida por LTB₄. LTB₄ liga-se à proteína G de membrana acoplada aos receptores BLT1 e BLT2 e induz uma cascata de sinalização intracelular complexa, resultando em atividade inflamatória nos neutrófilos [83]. Nossa hipótese foi corroborada pela redução acentuada da ativação do estresse oxidativo após o tratamento com AuNP-IgG em células estimuladas por LTB₄ ou PMA. A ativação do estresse oxidativo é um mecanismo realizado por fagócitos, tais como os neutrófilos e os macrófagos, para matar microrganismos fagocitados nos locais de inflamação. Em contraste com o LTB₄, o PMA penetra nas células e ativa as isoformas de quinases envolvidas na ativação do estresse oxidativo [83]. Em conclusão, nossos dados mostraram que a exposição aguda a AuNP-IgG não provocou efeitos tóxicos para o sistema vascular, mas causou efeitos anti-inflamatórios em neutrófilos circulantes através da sua atuação direta sobre o mecanismo de ação nas vias intracelulares do processo inflamatório. No entanto, os efeitos a longo prazo da exposição crônica devem ainda ser estudados.

O papel das AuNPs sobre a inflamação é um tema controverso e pode ser dependente do tamanho da partícula, tipo de modificação da superfície e da via de administração. Considerando que os efeitos anti-inflamatórios locais foram relatados em vários modelos experimentais de doenças tais como artrite e uveíte [84, 85], há relatos de que a administração sistêmica de AuNPs pode provocar ambos os efeitos, ou seja, anti- e pro-inflamatórios [54, 55]. Aqui, foi mostrado pela primeira vez que a injeção i.v. de bioconjugados de AuNP causam efeitos anti-inflamatórios por meio da modificação do perfil dos leucócitos circulantes.

As propriedades anti-inflamatórias de sais de ouro têm sido propostas há muito tempo, especialmente para o tratamento de doenças tais como a artrite reumatoide, psoríase e gota. Embora eficaz, eles foram descontinuados por causa de vários efeitos adversos [17]. Neste contexto, têm sido propostas novas formulações de sais e íons de ouro [18]. Todavia, os resultados aqui mostrados podem levar a novas possibilidades de tratamento de doenças inflamatórias, especialmente pela conjugação de AuNPs com outras drogas e moléculas de membrana específicas.

Em resumo, os NBCs de AuNP não causaram toxicidade significativa como confirmada nos estudos *in vitro* (nenhuma resposta imune ou citotoxicidade em células humanas de PBMC, PMN, eritrócitos e HUVEC) e *in vivo* usando a microcirculação de ratos Wistar machos como modelo. De fato, não foi observada nenhuma mudança na velocidade do fluxo sanguíneo, e nem o aparecimento de coágulos, micro-hemorragias ou trombos. Curiosamente propriedades anti-inflamatórias foram observadas *in vivo*, pela primeira vez, como indicado pela redução da interação leucócito-endotélio e do influxo de leucócitos para os tecidos adjacentes depois da estimulação com leucotrieno B4 (LTB4). Esta hipótese foi corroborada *in vitro*, pela diminuição acentuada da quimiotaxia e da ativação do estresse oxidativo dos neutrófilos de rato após o tratamento das células estimuladas com PMA ou LTB4 com AuNP-IgG. Esses resultados trazem novas perspectivas e expectativas sobre o potencial de aplicação de NBCs baseados em nanopartículas de ouro conjugadas a biomoléculas no diagnóstico e tratamento de doenças, além da entrega direcionada de drogas.

1.4.5. ELISA de Nanobioconjugados

O método ELISA (*Enzyme-Linked-Imunosorbent Assay*) é um ensaio imunoenzimático que utiliza um sistema de detecção de antígenos ou anticorpos presentes em algum fluido biológico, mais comumente o sangue, baseado em anticorpos conjugados com enzimas ou

fluoróforos. O princípio básico é a imobilização de um dos reagentes (p.ex., do antígeno H3.3), que tem afinidade por aquilo que se deseja detectar, em uma fase sólida (p.ex., placa de ELISA para microtestes com 96 poços), adiciona-se o fluido que contém o composto de interesse, seguido do outro reagente (neste exemplo, o anticorpo monoclonal IgG anti-H3.3) que está ligado a uma enzima ou fluoróforo, gerando um sinal facilmente detectável como fluorescência ou cor, que é diretamente proporcional à concentração do composto de interesse.

No caso, as nanopartículas de ouro apresentam uma intensa banda de absorção característica na região de 520 nm (SPB), que poderia ser utilizada no ELISA para monitoramento do resultado da hibridização por densitometria, ou mesmo visualmente sem a utilização de instrumentação como mostrado na **Figura 46**. Todavia, a sensibilidade foi muito prejudicada pelo fato de se ter somente a deposição de uma monocamada ou um filme extremamente fino (caminho óptico) de AuNP-mIgGs ligados à superfície da placa através da ligação antígeno-anticorpo, limitando a densidade óptica (D.O.).

Figura 50: *Ilustração de um poço da placa de ELISA modificado, em que a nanopartícula (esfera amarela) funcionalizada com anticorpo (laranja) foi retida devido à interação com o antígeno correspondente (vermelho).*

O método ELISA é interessante, pois pode confirmar a funcionalidade desses NBCs, isto é, confirmar a atividade do anticorpo que está ligado à AuNP, além de melhorar a sensibilidade do método para diagnóstico de doenças. Assim, foi realizada uma nova

adaptação do método ELISA para melhorar a sensibilidade. A mudança consistiu na adição de um último passo, que normalmente já é realizado num exame de ELISA convencional, onde adiciona-se um anticorpo secundário marcado com uma enzima ou fluoróforo. No caso, um anticorpo anti-coelho, pois no NBC AuNP-pIgG foi utilizado pIgG produzido em coelho. Este anticorpo é conjugado com uma enzima peroxidase que reage com TMB, gerando um composto de coloração azul que absorve fortemente em 655 nm. Além disso, este anticorpo é anti-cadeia leve, pois os NBCs baseados em *Fab* e *F(ab')₂* são constituídos das cadeias leves e parcialmente da cadeia pesada.

A ideia de se utilizar nanopartículas em ensaios de ELISA visa principalmente aumentar a sensibilidade do método e com isso diminuir a janela imunológica, pois nanomateriais apresentam grande área superficial. Da mesma forma que o IgM (imunoglobulina de estrutura pentamérica, geralmente produzida na fase aguda das doenças) apresenta maior sensibilidade ao método, um NBC contendo dezenas de anticorpos sobre uma única partícula-suporte deve apresentar sensibilidade ainda maior. E isto ocorre devido às proporções antígeno:anticorpo-primário e anticorpo-primário:anticorpo-secundário. No método ELISA tradicional, um anticorpo-primário reconhece de um a dois antígenos, e o secundário reconhece somente um primário. Assim temos que um ou dois antígenos correspondem a uma unidade de fluorescência ou cor. Já no ELISA utilizando NBCs, um único NBC reconhece de um a dois antígenos (pelo menos, mas pode acontecer de alguns outros anticorpos imobilizados na nanopartícula também se ligarem a outros anticorpos dependendo da distribuição espacial das mesmas) através de um único anticorpo ancorado na superfície da nanopartícula. Todavia, o anticorpo secundário não reconhece um único primário, mas algumas dezenas de anticorpos primários presentes na superfície, assim temos que um ou dois antígenos podem corresponder a algumas dezenas de unidades de fluorescência ou de cor.

A **Figura 51** mostra os gráficos de D.O. *versus* o inverso do fator de diluição das amostras, construídos a partir dos dados do leitor de ELISA em 655 nm obtidos das amostras de pIgG livre e os NBCs AuNP-pIgG, AuNP-Fab e AuNP-F(ab')₂. Observando o gráfico, pode-se perceber que a D.O. do NBC AuNP-F(ab')₂ > AuNP-IgG coelho > AuNP-Fab > AuNP-IgG de camundongo >= IgG do coelho, indicando que existe um aumento na sensibilidade do método utilizando-se os NBCs. Além disso, AuNP-IgG de coelho satura com uma taxa maior que do AuNP-F(ab')₂, que também é um pouco maior que do AuNP-Fab, assim mostrando que o AuNP-IgG mesmo não apresentando uma D.O. tão intensa quanto a do F(ab')₂, apresenta um título maior, isto é, mesmo em concentrações mais baixas ainda apresenta sinal.

Não foi possível obter um NBC AuNP-ProteínaA-IgG estável, por isso não está presente nos resultados. O NBC AuNP-IgG de camundongo foi usado como controle negativo, pois o anticorpo é de camundongo e não de coelho, sendo que o anticorpo secundário utilizado é de cabra anti-cadeia leve de anticorpo de coelho.

Os poços contendo IgG livre foram usados para comparar a sensibilidade do método ELISA com os poços contendo os NBCs. Assim, estimando que a quantidade de IgG imobilizada às nanopartículas de ouro era de 10 µg, utilizou-se a mesma quantidade de molécula livre visando facilitar a comparação. Além disso, os poços contendo IgG livre serviram como controle positivo do ensaio, pois foram os mesmos utilizados para a produção dos NBCs.

Figura 51: Gráfico da densidade óptica (u.a.) versus o recíproco do fator de diluição das amostras de pIgG livre e AuNP-pIgG, AuNP-Fab e AuNP-F(ab')₂ obtidos da leitura da placa de ELISA em 655 nm. O NBC AuNP-IgG_camundongo foi usado como controle negativo.

A)

B)

Figura 52: Espectros de extinção das amostras de AuNP-IgG de coelho, AuNP-IgG de camundongo, AuNP-ProtA, AuNP-Fab e AuNP-F(ab')₂ obtidos (A) antes e depois (B) da centrifugação e resuspensão em PBS. Leitura feita pelo leitor de placa de ELISA.

Ao centrifugar a suspensão de NBC sob as mesmas condições do ensaio anterior e ressuspendê-la em PBS, perdeu-se uma quantidade considerável deste material no fundo do tubo de centrifugação. Esta etapa de centrifugação da suspensão de NBC formado é imprescindível devido à presença de IgGs livres no meio, que acabarão competindo com os IgGs ancorados na nanopartícula durante a ligação com o antígeno ligado à parede do poço. Além disso, o pH da suspensão do NBC é em torno de 4,5, o que não é apropriado para a promoção da interação antígeno-anticorpo. Provavelmente, isto deve ter ocorrido devido à AuNP ser termodinamicamente meta-estável, o que acaba gerando diferentes níveis de agregação entre as partículas com o tempo. Ao interagir as proteínas com este agregado forma-se um agregado ainda maior que, sob centrifugação seguido de ressuspensão em meio com alta força iônica, gera um material totalmente amorfo e sem funcionalidade. Por isso, é importante trabalhar com AuNP recém sintetizadas por apresentarem poucos agregados de partículas e também investigar mais a estabilidade tanto das *cit*-AuNPs quanto de seus nanobiomateriais. O pH da suspensão de *cit*-AuNP foi ajustado a 9,5 que está acima do pI de todas as proteínas, tornando-as levemente negativas, o que mantém o potencial- ζ do sistema suficientemente negativo para aumentar a estabilidade coloidal do NBC formado, como já discutido.

Um ensaio preliminar mostrou que a caseína é o melhor agente de bloqueio, pois promoveu a resposta esperada no ensaio de ELISA. Além disso, mostrou que as *cit*-AuNPs praticamente não contribuem para a D.O. em 655 nm (D.O. média próxima a 0,045) conforme o esperado. De fato, a absorbância em 655 nm é próxima a zero (**Figura 52**), por isso não há necessidade de fazer este tipo de controle nos ensaios de ELISA utilizando-se HRP e TMB como reagentes.

Como perspectiva futura, provavelmente valerá a pena procurar dosar o sinal do ELISA por fluorescência, pois geralmente aumenta a sensibilidade da técnica devido ao

princípio intrínseco de detecção da mesma. Entretanto, sabe-se que AuNPs tendem a suprimir a fluorescência por transferência de elétrons e/ou de energia [86], mas talvez o revestimento proteico impeça ou diminua essa tendência.

1.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Estudos detalhados sobre a funcionalização e estabilidade de nanopartículas de ouro com biomoléculas, particularmente proteínas, foram realizados. Esta interação é espontânea, mas fatores como a proporção AuNP:proteína, força iônica do meio, pH, tamanho e pI das proteínas afetam diretamente a estabilidade. Esta depende, principalmente, do grau de recobrimento das AuNPs pela proteína, gerando nanopartículas que se repelem mais fortemente e impedem o processo de aglomeração. Foi verificado que a estabilidade de NBCs é suficientemente elevada para resistir a aumentos consideráveis de força iônica, em tampão PBS. Além disso, NBCs estáveis são produzidos quando o pH das suspensões de *cit*-AuNP previamente corrigido está acima do pI da proteína envolvida. Estes resultados são de grande valia para a formulação de sistemas para imunoensaio e nanossensores utilizando NBCs.

Foram produzidos com êxito anticorpos monoclonais anti-H3.3. e policlonais de coelho anti-tripomastigota com o intuito de iniciar os estudos de imunoensaio, sabendo-se que anticorpos policlonais proporcionam uma sensibilidade maior ao método. Entretanto, não foi possível remover os lipídeos presentes nos IgGs de coelho devido à presença de íons sulfato nas amostras mesmo após diálise, devido à precipitação de sulfato de cálcio na primeira etapa de purificação pelo método de precipitação da proteínas com sulfato de amônio 50% m/m. Além disso, a digestão dos anticorpos com papaína e pepsina imobilizadas foi realizada com sucesso.

Ensaio de ELISA foram realizados com AuNP-IgG, AuNP-Fab e AuNP-F(ab')₂ visando verificar a manutenção da funcionalidade do IgG ancorado à superfície das nanopartículas. Desta forma, verificou-se que apresentam uma resposta mais intensa em relação à mesma quantidade de IgG livre utilizado como controle, corroborando a hipótese de

que esses NBCs tem potencial para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis do que os atualmente empregados.

Os testes de toxicidade mostraram que os NBCs de AuNP não apresentam toxicidade aguda tanto nos estudos *in vitro* (nenhuma citotoxicidade em células humanas de PBMC, PMN, eritrócitos e HUVEC, e sem causar resposta imune) quanto no modelo *in vivo* utilizando ratos Wistar machos. Avaliando a microcirculação desses ratos, não foi observada mudança na velocidade do fluxo sanguíneo, e nem foram observados a formação de coágulos, micro-hemorragias ou trombos. Mas curiosamente propriedades anti-inflamatórias foram observadas *in vivo*, pela primeira vez, como indicado pela redução da interação leucócito-endotélio e do influxo de leucócitos para os tecidos adjacentes depois da estimulação com leucotrieno B4 (LTB4). Esta hipótese foi corroborada *in vitro*, pela diminuição acentuada da quimiotaxia e da ativação do estresse oxidativo dos neutrófilos de rato após o tratamento das células com AuNP-IgG estimuladas previamente com PMA ou LTB4. Esses resultados trouxeram novas perspectivas e expectativas sobre o potencial de aplicação de NBCs baseados em nanopartículas de ouro conjugadas a biomoléculas no diagnóstico e tratamento de doenças, além da entrega direcionada de drogas.

CAPÍTULO 2

NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS

2.1. OBJETIVOS

Este segundo foco em nanopartículas magnéticas baseadas em magnetita visou explorar as suas propriedades no campo de diagnóstico por imagem por ressonância magnética (IRM). Assim, nanopartículas superparamagnéticas catiônicas de 7 nm de diâmetro foram exploradas como agente de contraste em IRM e como plataforma para entrega direcionada através de acumulação magnética, possibilitando a sua aplicação e exploração para desenvolvimento de novos ou melhorados métodos de diagnóstico de doenças. Para tanto, testes de toxicidade *in vivo* também foram realizados para confirmar a biocompatibilidade que essas nanopartículas apresentam.

2.2. INTRODUÇÃO

2.2.1. A História das Nanopartículas Magnéticas

Desde a Idade do Ferro, este elemento sempre exerceu um papel considerável no desenvolvimento da civilização. Naquela época, o homem descobriu que poderia retirar o ferro de seus minérios reduzindo-o com carvão vegetal, o que possibilitou a criação de diversas ferramentas e implementos à humanidade. Com o advento da Revolução Industrial, originou-se um inédito processo de produção de ferro em grande escala e a baixo custo, a partir de coque, cujo método foi desenvolvido por Abraham Derby, tornando possível a construção de pontes, navios, caldeiras e trilhos a partir do ferro.

O ferro é o quarto elemento químico mais abundante da crosta terrestre e seus principais minérios são: a hematita (Fe_2O_3), a magnetita (Fe_3O_4), a limonita ($\text{FeO}(\text{OH})$) e a siderita (FeCO_3). Pela reconhecida relevância das aplicações do ferro, a sua produção é uma das maiores do mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor. Segundo os dados da USGS [87], em 2014 o Brasil produziu 320 milhões de toneladas de ferro e possui reserva de 31 bilhões de toneladas de minério cru, dos quais 16 bilhões correspondem ao ferro.

Dentre os principais minérios de ferro encontrados na natureza, a magnetita é um dos mais abundantes, sendo encontrado em rochas ígneas e metamórficas. É um mineral preto formado pela mistura de óxidos de Fe(II) e Fe(III) (Fe_3O_4), altamente magnético, sendo algumas de suas variedades naturalmente magnéticas, razão pela qual foi empregada na confecção de bússolas, principalmente.

Contudo, nas últimas quatro décadas, nanopartículas baseadas em óxidos de ferro vem sendo exploradas em inúmeras aplicações, dentre as quais se destacam fluídos magnéticos, catálise, biomedicina/bionanotecnologia, diagnóstico de imagem por ressonância magnética e remediação ambiental [88]. Controlando as propriedades físico-químicas e a funcionalização

da superfície dessas nanopartículas, é possível obter nanomateriais estáveis em diversas condições. Na maioria das aplicações previstas, as partículas que apresentam melhor desempenho têm tamanho abaixo de um valor crítico, e se encontram tipicamente na faixa de 5-20 nm de diâmetro.

No campo da medicina, nanodispositivos magnéticos estão sendo aplicados para o diagnóstico por imagem por ressonância magnética (IRM) [89, 90]; biossensores ou métodos de análises clínicas, como o ELISA [91, 92]; tratamento de doenças [93] ou moléstias por hipertermia [94-96] ou direcionamento de drogas [93, 95, 97]; engenharia e reparação de tecidos [98, 99]; separações magnéticas, tanto bioquímicas quanto celulares, para a realização de bioanálises [100, 101], dentre muitos outros usos.

O grande diferencial da aplicação das nanopartículas magnéticas neste campo se dá em relação aos medicamentos tradicionais ainda utilizados. Diferentemente deles, estas estão sendo projetadas para localizar e se acumular no sítio-alvo da doença ou moléstia, assim diminuindo os efeitos colaterais e a dose administrada para o tratamento. Outro importante avanço da nanotecnologia neste campo é o design de nanopartículas para o desenvolvimento de teragnóstica, isto é, diagnóstico por imagem concomitantemente com o tratamento, como por exemplo IRM e hipertermia. Atualmente, já há alguns nanossistemas magnéticos disponíveis no mercado ou em fase de testes clínicos, comprovando o seu potencial para aplicações farmacêuticas e biomédicas.

2.2.2. Propriedades Químicas, Físicas e Biológicas das USPIOs

Como acima mencionado, recentemente muitos esforços têm sido realizados no desenvolvimento e na transferência das inovações em nanotecnologia para a prática médica, principalmente na área de teragnóstica, onde materiais e/ou técnicas combinam a capacidade de diagnóstico e tratamento. Assim, dentre os diversos nanomateriais já desenvolvidos, as

nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (no inglês, *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (SPIOs)) ganham destaque devido às suas propriedades químicas, físicas e biológicas, pelo que serão abordadas com mais detalhe em seguida.

Uma das características das SPIOs que mais denota a sua importância seria a elevada magnetização. O fato de serem magnéticas traz muitas vantagens experimentais (na manipulação das amostras) e de praticidade na aplicação, pois com um simples ímã pode-se controlar a sua separação e direcionamento. Nesse sentido, a sua elevada magnetização, considerada a dimensão desses materiais, potencializa ainda mais as suas aplicações. Ainda, a acumulação induzida de SPIOs em tecido ou células e a separação magnética de biomoléculas como proteínas, enzimas ou DNA, pode ser com um ímã.

Para compreender esta propriedade superparamagnética, parte-se do conceito de que todo material ferromagnético macroscópico (*bulk*) é formado por pequenos domínios magnéticos como esquematizado na **Figura 53**. Esses domínios são formados por átomos de ferro (II) e (III) que estão alinhados de tal forma que seus momentos magnéticos se somam, gerando um momento magnético resultante num dado domínio. Estima-se que estes domínios têm tamanho máximo de ~20-30 nm. Por isso cada nanopartícula corresponde a um único domínio magnético, apresentando comportamento superparamagnético quando a temperatura está acima da chamada temperatura de bloqueio. Uma alusão a isto seria considerar a nanopartícula como um composto paramagnético gigante que apresenta uma resposta rápida a campos magnéticos externos aplicados, além de magnetização residual e coercitividade (campo necessário para trazer a magnetização para zero) desprezíveis.

Figura 53: Representação esquemática dos domínios magnéticos presentes no interior de um material ferromagnético. Retirado de [102].

Outra vantagem dessas nanopartículas é a facilidade de modificar quimicamente a sua superfície de acordo com a aplicação desejada, como por exemplo: propiciar maior biocompatibilidade no organismo pela presença de biopolímeros (dextran, carboxidextran, celulose, dentre outros polissacarídeos); maior tempo de meia-vida no sangue com a presença de polietilenoglicol (PEG); carrear e entregar fármacos (tratamento) ou marcadores (diagnóstico) diretamente nos órgãos ou tecidos comprometidos, etc.

Esta modificação não é somente importante para tornar a nanopartícula funcional a uma determinada aplicação, mas também para sanar o problema inevitável associado a partículas com tamanho nanométrico. Sua instabilidade intrínseca em relação à tendência à formação de aglomerados para reduzir a energia associada à elevada área superficial em relação ao volume das partículas nanométricas. Além disso, nanopartículas metálicas não protegidas se caracterizam também por serem quimicamente reativas devido à esfera de coordenação dos átomos de ferro presentes na superfície das partículas ser incompleta, razão pela qual são facilmente oxidadas ao ar, resultando na perda de magnetismo e de dispersabilidade. Portanto, é crucial desenvolver estratégias de proteção para estabilizar quimicamente as nanopartículas magnéticas contra a degradação durante ou após a síntese. Estas estratégias incluem o revestimento com uma camada de espécies orgânicas, incluindo

agentes tensoativos ou polímeros, ou com material inorgânico, tal como sílica ou carbono, que posteriormente podem ser funcionalizadas em função da aplicação desejada.

A superfície das SPIOs pode ser modificada quimicamente, em analogia com as AuNPs, de modo a garantir a estabilidade coloidal nos NBCs resultantes. Além disso, a molécula protetora adicionado na síntese do núcleo magnético é essencial para controlar o tamanho e estabilizar o núcleo, evitando a agregação das partícula e deve ser escolhido de acordo com o fim desejado. Geralmente, apresentam dois grupos funcionais em posições estrategicamente opostas, onde um se liga ao núcleo magnético e o outro permitirá a reação com uma biomolécula, que também apresenta um grupo funcional reativo para efetivar a reação de hibridização/conjugação nanopartícula-biomolécula.

Por isso, podem ser preparadas nanopartículas funcionalizadas com diversas moléculas direcionadoras (peptídeos, proteínas, aptâmeros), terapêuticas (quimioterápicos, antibióticos, anti-inflamatórios) e de sinalização (corantes fluorescentes, agentes radioativos e outros reportadores), permitindo ajustar suas propriedades a aplicações específicas. No presente, há uma tendência dessa modificação ser do tipo “mista”, isto é, duas ou mais moléculas diferentes concomitantemente ligadas à superfície das nanopartículas para lhe conferir múltiplas propriedades, inclusive sinérgicas.

A exemplo dessas aplicações, um gradiente de campo magnético pode ser utilizado para manter ou direcionar as SPIOs para um local desejado no organismo após sua administração intravenosa ou intraperitoneal [103], e assim liberar drogas ou outros compostos de interesse investigativo e/ou terapêutico. Outra propriedade interessante é o aprimoramento da eficiência na ação de drogas anti-câncer quando presas à superfície de nanopartículas magnéticas em comparação à sua administração direta na forma livre. Nesse sentido, Durdureanu-Angheluta e colaboradores [104] perceberam que a viabilidade celular foi drasticamente reduzida (para aproximadamente 10%) após a exposição de células HepG2

a nanopartículas magnéticas revestidas com heparina e Rhein, quando comparada com células expostas ao fármaco livre em solução, indicando o potencial destas nanopartículas de magnetita na terapia do câncer. Igualmente, Lee e colaboradores [105] demonstraram que o potencial terapêutico de mitoxantrona ligada à superfície de nanopartículas magnéticas na terapia direcionada contra o câncer de próstata era mais eficaz quando acoplada ao veículo de entrega de droga do que somente pura.

Além disso, SPIOs podem ser utilizadas no tratamento de algumas doenças através da hipertermia, ou seja, atuam como sementes térmicas capazes de aumentar a temperatura da sua vizinhança imediata. Essa característica é induzida a partir de dois mecanismos conhecidos: 1) absorver e converter energia eletromagnética em calor, ou 2) acoplar seu momento magnético a um campo magnético oscilante, resultado num aumento de temperatura devido ao atrito causado pela sua rotação. Sivakumar e seus colaboradores [106] produziram nanopartículas magnéticas revestidas com duas gomas exopolisacarídicas bacterianas (mauran e gellan), que exibiram excelente índice de biocompatibilidade com baixa citotoxicidade celular, alto potencial terapêutico através da hipertermia magnética e comportamento superparamagnético, reforçando sua utilização como possíveis candidatos para a entrega direcionada de drogas específicas, diagnóstico por imagem das células de câncer e também do tratamento via hipertermia magnética. Todavia, não há protocolos bem definido para preparação e funcionalização das nanopartículas, fazendo com que sua produção seja pouco reprodutível e custosa.

Mas, nesse contexto, um bom controle sobre a síntese e funcionalização da superfície dessas nanopartículas revela-se essencial para manter e/ou otimizar as propriedades físico-químicas *in vivo* e *in vitro*, garantir a tolerância e biocompatibilidade, além de seu destino/direcionamento (farmacocinética) e atividade biológica (farmacodinâmica) no organismo [107]. Assim, o recobrimento da superfície e o equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico

devem ser cuidadosamente controlados para as aplicações *in vivo*, a fim de assegurar a estabilidade coloidal adequada em fluídos biológicos. Além disso, pequenas nanopartículas com uma distribuição de tamanhos estreita e estabilidade coloidal, bem como elevada susceptibilidade magnética e relaxatividade, são desejáveis.

Para finalizar, sabe-se que nanopartículas superparamagnéticas distribuídas em um campo magnético induzem altos gradientes de campo magnético locais, encurtando os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e especialmente, transversais (T_2) dos spins nucleares do hidrogênio da água, assim como o tempo de decaimento de indução livre (FID) (T_2^*) dos sinais de RMN. De fato, a sensibilidade obtida com SPIO é mais elevada do que aquela apresentada pelos complexos de gadolínio comercializados atualmente como agentes de contraste para IRM no Brasil. No entanto, a eficiência é fortemente dependente da composição, morfologia, tamanho e distribuição de tamanho das partículas, grau de cristalinidade e agregação [108], além da magnetização. Portanto, compreender as relações entre esses parâmetros intrínsecos e os processos de relaxação intrínsecas de spins nucleares (núcleos de prótons) sob a influência de nanopartículas magnéticas pode fornecer informações críticas para projetar e aumentar a performance de nanopartículas magnéticas nas diversas aplicações em IRM.

Alguns agentes de contraste comerciais para IRM à base de nanopartículas de magnetita, como Resovist (SHU-555A, Bayer Schering Pharma AG), Supravist (SHU-555C, a Bayer Schering Pharma AG), Sinerem (AMI-227, Guerbet) e Endorem (Pharmaceuticals AMAG Inc.), vêm sendo ou foram comercializados nos EUA e na Europa como agentes de diagnóstico mais eficazes e mais seguros do que os compostos à base de gadolínio. Infelizmente, seu custo ainda é elevado, e muitos foram retirados do mercado. Por isso, novas SPIOs com preços mais acessíveis devem ser desenvolvidos para popularizar seu uso.

2.2.3. Toxicidade de Nanomateriais Magnéticos de Óxido de Ferro

Com o avanço da tecnologia e diante de um cenário mundial com doenças e moléstias diversas, muitos equipamentos e técnicas de diagnóstico foram desenvolvidos para melhor atender às necessidades da sociedade, e já estão presentes em hospitais e laboratórios de análises clínicas.

Na prática clínica, os exames de diagnóstico são realizados para complementar e corroborar os dados históricos e o exame físico/clínico efetuado nos pacientes pelos médicos e auxiliar no diagnóstico. Por isso, é fundamental que o resultado do exame seja rápido, precoce (doença detectável em estágio inicial), exato e preciso (tenha alto grau de confiabilidade) para que seja tomada a melhor conduta para o tratamento do paciente. Atualmente, existem centenas de exames de diagnóstico laboratoriais e de imagem disponíveis no mercado, cada qual específico para uma determinada doença ou injúria. Nesse contexto, as técnicas de diagnóstico por imagem ganham destaque por fornecer riqueza de detalhes como avaliação anatômica, morfológica e até funcional dos órgãos e estruturas internas de interesse.

Dentre todas as técnicas de diagnóstico por imagem, a imagem por ressonância magnética (IRM) é considerada uma das mais importantes por não ser invasiva, não utilizar fonte de radiações ionizantes, oferecer imagens multiplanares da região de interesse investigativo, diferenciar tipos de tecidos e estruturas baseados na intensidade de sinal, ter bom contraste de imagem e alta resolução espacial.

No Brasil, essa técnica faz uso de agentes de contraste baseados em compostos paramagnéticos de gadolínio para facilitar a visualização e identificação de tecidos e outras estruturas como tumores. Entretanto, existem pacientes que sofrem reações adversas à administração intravenosa desse composto, sendo as mais comuns enjoo, mal-estar e alergia. O efeito adverso mais grave consiste na fibrose nefrogênica sistêmica, que ocorre em

pacientes com insuficiência renal, causando um espessamento da pele, dos órgãos e de outros tecidos [109]. Falha na produção ou no controle de qualidade deste composto pode acarretar a morte de pacientes, devendo o gadolínio (metal extremamente tóxico) estar devidamente quelado. Esta condição é necessária para promover a biocompatibilidade e evitar toxicidade aguda ao organismo.

A toxicidade, que parece depender de tamanho, formato, composição química, carga e estado de aglomeração de nanopartículas, é outra questão importante a ser abordada antes de sua utilização em qualquer aplicação biomédica [110]. Por este motivo, muitos esforços têm sido realizados para avaliar a biocompatibilidade e possíveis efeitos adversos que as SPIOs podem causar no organismo. Por exemplo, Wu e colaboradores [111] avaliaram *in vivo* a biodistribuição, a eliminação e biocompatibilidade de SPIOs (diâmetro de 11 nm) revestidas com ácido oleico e o polímero pluronics. Eles não observaram alterações nos níveis de enzimas do fígado ou no estresse oxidativo em ratos macho Sprague-Dawley, e foram completamente eliminadas do organismo três semanas após sua administração intravenosa (IV). Por outro lado, Marcu e colaboradores [112] incubaram SPIOs recobertas com Violamicina B1, um antibiótico da classe das antraciclina, com células da linhagem MCF-17 de câncer de mama, promovendo o aumento da atividade de absorção e morte celular. Sun e colaboradores [113] mostraram que a toxicidade depende mais do tipo de revestimento da superfície das SPIOs do que da quantidade de nanopartículas de óxido de ferro presente na célula. SPIOs revestidas com grupos amino ou carboxilato mostraram ser não tóxicas contra uma linhagem celular endotelial de microvasos de cérebro de camundongo (bEnd.3) e uma cultura primária de astrócitos e de neurônios de ratos, em concentrações abaixo de 100 µg/mL. Em doses superiores, os neurônios mostraram-se mais sensíveis às amino-SPIOs, enquanto que os astrócitos foram mais vulneráveis às carboxi-SPIOs. Mais recentemente, a biodistribuição de microbolhas de álcool polivinílico carregadas com SPIOs [114] foi

estudada por IRM usando ratos Sprague-Dawley durante seis semanas, resultando em acumulação nos pulmões, e, em seguida, nos macrófagos pulmonares, hepáticos e do baço, enquanto que a concentração citoplasmática de ferro aumentou nos pulmões e em outros órgãos.

Em sua grande maioria, as SPIOs também têm se mostrado bastante seguras. Centenas de estudos de toxicidade publicados ao longo de muitos anos, além daqueles já clinicamente aprovados, corroboram esta hipótese. Entretanto, ainda carece-se de estudos sobre os seus efeitos biológicos em outros sistemas *in vivo* e *in vitro* ainda não explorados, visando, maximizar as possibilidades. Contudo, nota-se que, infelizmente, muitas vezes o uso comercial acaba por dispensar ou ignorar a prudência que uma postura de maior cautela recomendaria, o que tem causado transtornos ao homem e ao meio-ambiente, além de reforçar o negativismo geral em relação à imagem que a nanotecnologia tem frente à sociedade.

Uma das aplicações reais mais notáveis das SPIOs, que reforçam a sua segurança, consiste na sua utilização como agentes de contraste em exames de Imagem por Ressonância Magnética (IRM), pois mostraram ser mais seguros e mais eficientes do que os atuais compostos baseados em gadolínio. Nota-se também que inúmeras outras propostas de aplicações rumam ao objetivo de atender às atuais necessidades desse campo, mediante a exploração de SPIOs como plataforma para o desenvolvimento de novos nanomateriais que combinam capacidades de direcionamento (químico ou magnético), monitoramento (acompanhamento ao longo do tempo) e tratamento.

Face às propriedades da nanopartícula magnética ora ressaltadas, a presente tese demonstra a potencialidade de SPIOs ultrapequenas (7 nm de diâmetro), funcionalizadas com grupos etilamina (catiônicos) e totalmente dispersáveis em meio aquoso como agente de contraste em IRM. Não apresentaram toxicidade aguda *in vivo*, mas possuem alta eficiência

como contraste (alta relaxatividade, $R_2 = 178 \text{ mm}^{-1}\text{s}^{-1}$ em 0,47 T). Por isso mostraram grande potencial como plataformas para desenvolvimento de materiais para teragnóstica.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Síntese das Nanopartículas Superparamagnéticas

Visando a utilização de nanopartículas magnéticas como plataforma para o desenvolvimento de nanodispositivos para diagnóstico e tratamento de doenças, assim como se pretendeu em relação às nanopartículas de ouro também sob estudo, SPIOs foram produzidos e caracterizados pelo Dr. Sérgio H. Toma, como descrito a seguir.

As nanopartículas magnéticas baseadas em magnetita foram preparadas pelo método de termodecomposição em solvente de alta temperatura de ebulição partindo-se de um sal de ferro(III) e moléculas estabilizantes que se ligam à superfície. Os reagentes foram dissolvidos e a temperatura mantida à ebulição por 1 hora, fazendo com que a coloração da mistura reacional mudasse de alaranjado para preto. Apesar do aspecto de solução, ao se aproximar um ímã, claramente pode-se perceber a magnetização e atração do líquido resultante, indicando a formação de nanopartículas de magnetita funcionalizadas e dispersas, gerando fluídos magnéticos.

As nanopartículas foram isoladas e purificadas por sucessivas precipitações com adição de etanol e acetona, e separação magnética com o auxílio de um ímã. Ao final, o sólido foi seco em estufa a 100 °C por duas horas, e, em seguida, sob vácuo, em dessecador, por 24 horas. Dada as características dos ligantes em sua superfície, as nanopartículas podem ser prontamente dispersadas em água deionizada sem a necessidade de agitação vigorosa.

Os tamanhos médios das nanopartículas foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) no laboratório LIEC-UFSCar, utilizando o microscópio Philips CM200 e voltagem de aceleração de a 200 kV com acessório de análise química por energia dispersiva (EDS). As amostras foram dispersas em redes de cobre recobertas com carbono. A distribuição de tamanhos também foi avaliada por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

utilizando-se o equipamento Nanotracs (*Microtracs*) do LQSN.

Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas catiônicas ultrapequenas foram preparadas por termodecomposição de complexos de ferro(III) em solvente de elevado ponto de ebulição e na presença de grupos protetores hidrofílicos, de acordo com o método descrito por Caruntu [115]. Após uma hora sob 210° C, a cor da mistura reacional mudou de laranja para preto, como esperado, devido à formação de nanopartículas de magnetita. A mistura reacional foi esfriada até 90° C e em seguida, 0,5 mol de o-fosforiletanolamina foi adicionado por mol de Fe₃O₄, deixando sob agitação por mais uma hora. As USPIOs funcionalizadas com etilamina foram isoladas como um sólido preto através do resfriamento da mistura reacional até a temperatura ambiente e separadas com um ímã. O sólido foi lavado duas vezes com etanol e três vezes com uma mistura 1:1 v/v de etanol e acetona, e seco num dessecador sob vácuo durante 24 horas. Devido à presença de grupos hidrofílicos na superfície pela funcionalização das USPIOs com grupos etilamina catiônicos, estas nanopartículas são facilmente dispersáveis em água.

O tamanho médio das partículas e a morfologia foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram preparadas adicionando-se uma gota da dispersão coloidal numa rede de cobre recoberta com um filme de carbono. A distribuição média de tamanho de partícula e potencial- ζ foram avaliadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento Zetatrac da Microtracs.

As medidas de relaxatividade dos hidrogênios presentes nas moléculas de água foram realizadas num espectrômetro Bruker Minispec mq20, utilizando sequência de pulsos CPMG (Carr-Purcell Meiboom Gill) (campo magnético = 0,47 T) pelo Dr. Sérgio Toma, através da diluição de uma dispersão coloidal concentrada em água deionizada de modo a obter amostras com 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10, 5 e 2 mg L⁻¹ de Fe₃O₄. A temperatura foi mantida constante a 25° C por meio de um banho termostático. O tempo de relaxação T₂ foi

determinado pela plotagem das curvas de decaimento multi-exponenciais no software Multiexp, e a relaxatividade estimada a partir do gráfico do recíproco de T_2 em função da concentração de Fe_3O_4 . Esta foi determinada pela técnica de espectroscopia de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) em um equipamento iCAP 6500 Duo da Thermo Fisher Scientific (Cambridge, Reino Unido) com visualização de plasma axial.

2.3.2. Imagem por Ressonância Magnética e USPIOs

Esse estudo foi realizado estritamente de acordo com as recomendações contidas no “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde” (Publicação 8523 do NIH). O protocolo foi aprovado pela Comitê de Ética de Usos e Cuidados do Animal (CECUA) do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (Certificado Nº: 07/2013), o qual segue a regulamentação do CONCEA (Conselho Nacional de Cuidado e Experimentação Animal) do Brasil. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Said Rabbanni e Dr. Hernán Joel do IF-USP, além da Profª Drª Sandra Farsky, Dr. Stephen Rodrigues, Ana Lúcia Shimada e Dr. Rodrigo Azevedo da FCF-USP.

Dada a importância da utilização de nanopartículas magnéticas na área médica e farmacológica, particularmente o seu uso como plataformas para novos métodos de diagnóstico e tratamento de doenças, foi explorado seu potencial como agente de contraste em Imagem por Ressonância Magnética (IRM). Para tanto, o estudo foi desenvolvido em três etapas: 1) a exploração do potencial das nanopartículas magnéticas (SPIOs) como agentes de contraste em IRM utilizando-se ratos machos da linhagem Wistar, 2) a acumulação magneticamente induzida dessas nanopartículas em locais de interesse terapêutico por campo magnético externo (ímã) e acompanhamento por IRM e 3) estudo de sua toxicidade por microscopia intravital *in vivo*, dosagens de enzimas hepáticas e renais, além do leucograma, utilizando-se os mesmos ratos. Segue abaixo a descrição experimental destas três etapas.

O desempenho da USPIO catiônica funcionalizada com etilamina como agente de contraste para IRM foi avaliado após a administração intravenosa (IV) de 10 mg/kg de peso corporal (de agora em diante "mg/kg" será utilizado no lugar de "mg/kg de peso corporal" para melhorar a clareza durante a leitura) de nanopartículas dispersas em 1 ml de tampão acetato (10 mM, pH 4,5) contendo 50 mM de NaCl, e através da realização do exame de IRM. As amostras com USPIO foram injetadas IV, durante 10 minutos, através de uma cânula inserida na veia femoral esquerda de três (n=3) ratos Wistar machos (aproximadamente 200 g de peso corporal) previamente anestesiados com 75 mg/kg de cetamina e 7,5 mg/kg de xilazina (Vetbrands, Jacarei, SP, Brasil). Todas as amostras para administração IV foram preparadas imediatamente antes do uso simplesmente pela dispersão do pó contendo USPIO em tampão acetato, necessário para protonar os grupos etilamina na superfície e assim, facilitar a sua dispersão em meio aquoso. Imagens de IRM foram coletadas a partir de cerca de 60 minutos até 28 dias após a administração IV para confirmar sua potencialidade como agente de contraste, além do acompanhamento da biodistribuição *in vivo* dessas nanopartículas e sua eliminação do organismo. Os animais foram anestesiados com injeção i.p. de 75 mg/kg de cetamina e 7,5 mg/kg de xilazina imediatamente antes da realização do exame de ressonância magnética. Todas as imagens foram registradas num equipamento Gyroscan S15 ACSII de 1.5 T da Philips Medical System, Endovein, Holanda, utilizando uma bobina de 22 cm de diâmetro. As imagens foram registradas no sentido coronal e os principais parâmetros utilizados nos experimentos estão listadas na **Tabela 6**.

A possibilidade de acumulação magneticamente induzida das USPIOs em um local pré-determinado pode ser de grande interesse no tratamento de tumores localizados, placas de ateroma ou até mesmo de tumores cerebrais e de acidente vascular cerebral. Por exemplo, nanopartículas de magnetita funcionalizadas com medicamentos ou com outros agentes terapêuticos podem ser concentradas na região afetada, e o tratamento de hipertermia pode ser

realizado. Naturalmente, uma força suficientemente elevada deve atuar sobre as nanopartículas para superar as forças de dispersão como o fluxo sanguíneo e a energia térmica. A fim de avaliar esta possibilidade e determinar o efeito da dose de USPIO administrada (10 ou 50 mg/kg) sobre a intensidade de contraste na imagem e a sua eliminação posterior, a mesma experiência descrita acima foi repetida utilizando-se dois grupos de três (n=3) ratos Wistar machos em cada grupo, enquanto um magneto foi mantido no lado exterior da coxa da perna esquerda durante duas horas após a injeção i.v.. Este local foi escolhido pelo fato de a acumulação espontânea das USPIO não ser esperada. Assim, toda a acumulação pode ser atribuída exclusivamente ao processo de concentração magnética. Após duas horas, o magneto foi removido e as imagens de IRM foram tiradas o mais rapidamente possível para monitorar a concentração magnética, a eliminação e eventual redistribuição das USPIOs em função do tempo. Imagens de ressonância magnética foram coletadas duas horas, 1, 7, 14, 21 e 28 dias após, e 2, 30, 60, 100 e 140 dias após a administração de 10 ou 50 mg/kg de USPIO, respectivamente. Um ímã (NdFeB) com 1 cm² de área e densidade de fluxo magnético máximo de 0,6 T foi usado no experimento.

2.3.2.1. USPIOs como Agentes de Contraste em IRM

O potencial de utilização das USPIOs como agentes de contraste em IRM foi avaliado através de um teste piloto utilizando somente um rato macho da linhagem Wistar. Para tanto, foram administradas via intravenosa (i.v.) 10 mg de USPIO no animal previamente anestesiado através da canulação da veia femoral. A administração foi realizada por meio da injeção de 1 mL da suspensão de 10 mg/mL de USPIOs em tampão acetato 10 mM e NaCl 50 mM, por cerca de 10 minutos. As varreduras para coleta de imagens IRM foram realizadas após uma hora, 24 horas e por vários dias após a administração, ao longo de quatro meses e meio.

As imagens foram realizadas num aparelho de imagem por ressonância magnética de 1,5 Tesla (Gyrosan S15 ACSII, PhilipsMedical Systems, Endovein, Holanda) utilizando uma bobina de superfície de 22 cm, no Laboratório de Ressonância Magnética do Prof. Dr. Said Rabbani do Instituto de Física da USP. As imagens dos ratos foram obtidas na direção coronal. Os principais parâmetros das sequências utilizadas estão apresentados na **Tabela 6** abaixo.

Tabela 6: *Parâmetros utilizados para obtenção das sequências de imagens por IRM.*

Parâmetro	Valor
Sequência de imagens	GRET2* (FFE)
Espessura da fatia (mm)	1,00
Tempo de repetição (ms)	266
Tempo de eco (ms)	15
Campo de visão (mm ²)	200,00 x 110
Direção da fatia	Coronal
Número da fatia	entre 40 a 46
Ângulo de indução	25
Resolução da imagem (pixels)	256
Duração do imageamento (min)	aprox. 54

2.3.2.2. Magneto-Direcionamento de USPIOs

Para direcionar e acumular nanobioconjugados (NBCs) magnéticos em locais de interesse terapêutico como um tumor, tecido inflamado ou até mesmo o cérebro, pode-se recorrer a um campo magnético externo focalizado na região de interesse. É de esperar que esses materiais, mesmo sem modificadores químicos que direcionem espontaneamente para

uma dada região, se acumulem devido a um campo magnético aplicado. Desta forma, o seguinte experimento foi realizado visando confirmar a hipótese de magneto-direcionamento.

Foram estabelecidos dois grupos de experimentação, cada qual com três ratos ($n=3$), sendo injetadas nanopartículas em ambos. Mas em um dos grupos, no momento anterior a administração intravenosa, um pequeno ímã de 1 cm^2 de área foi fixado no lado externo da coxa esquerda (local onde não se espera qualquer acumulação espontânea de nanopartículas) oposta àquela em que foi realizada a aplicação i.v. das nanopartículas (na veia femoral) para acumulação magnética não espontânea no tecido muscular do animal. Feita a administração das nanopartículas e aguardado o período de duas horas para acumulação induzida pelo ímã, os animais foram levados ao IRM para a obtenção das imagens após duas horas, 24 horas e a cada semana, ao longo de quatro semanas. O animal foi anestesiado via intraperitoneal (i.p.) com a quantidade suficiente de cetamina/xilazina (75 mg/kg e 7,5 mg/kg, respectivamente) para manter o animal anestesiado durante uma hora e meia, condição necessária para o animal ficar imóvel durante todo o período de obtenção das imagens. Em ambos os grupos foi administrado 1 mL da suspensão de nanopartículas de 2 mg/mL de USPIOs em tampão acetato 10 mM e NaCl 50 mM em cada rato via i.v. na veia femoral durante 10 minutos.

2.3.3. Estudo da Toxicidade *in vivo* das USPIOs

Paralelamente ao estudo que explora o potencial das USPIOs como agentes de contraste em IRM e sua capacidade de magneto-direcionamento, também foram explorados seus efeitos tóxicos no organismo após a administração i.v., pois a sua utilização como agente de contraste em IRM somente será viável caso não apresentem efeitos tóxicos e os efeitos colaterais ao paciente sejam minimizados.

Para tanto, a toxicidade *in vivo* das USPIOs foi avaliada por microscopia intravital, testes bioquímicos e leucograma dos ratos ao longo de todo o estudo. E para confirmar a

eliminação de ferro pelo organismo, o teor de ferro nas amostras de urina colhidas dos seis ratos foi determinada ao longo das quatro semanas por espectroscopia de absorção atômica com atomização em forno de grafite, em colaboração com o Prof. Dr. Pedro Vitoriano e o Dr. Maciel Santos Luz.

Foram avaliados por microscopia intravital, o comportamento e os efeitos das nanopartículas quando administradas i.v. em ratos Wistar, como mudanças no comportamento leucocitário (rolamento, aderência e migração) e no diâmetro de veia na microcirculação mesentérica e hepática.

Tendo em vista a aplicação das USPIOs catiônicas como agentes de contraste em diagnósticos de IRM, os seus possíveis efeitos tóxicos foram avaliados para os mesmos grupos de ratos usados nos experimentos anteriores de ressonância magnética utilizando-se ensaios laboratoriais *ex vivo*, tais como a dosagem de enzimas hepáticas e renais, e contagem de leucócitos no sangue. Também foram realizadas análises *in vivo* de vênulas mesentéricas e de sinusóides hepáticos após a administração IV de USPIO em ratos Wistar machos por microscopia intravital. Além disso, o teor de ferro na urina foi monitorado a fim de estudar a influência da quantidade de USPIO retida no corpo durante todo o processo de eliminação através da urina.

A concentração magneticamente induzida das nanopartículas foi avaliada administrando 10 mg/kg de USPIO em dois grupos de três animais, e comparando a IRM desses dois grupos. O grupo experimental e de controle diferem respectivamente apenas pela presença e ausência de um magneto colocado na coxa esquerda durante duas horas. Dois outros grupos de três ratos cada (controle *sham* na ausência e na presença de magneto na coxa) foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, exceto pelo fato de que foi injetado 1 ml de solução salina (0,9% w/w de NaCl em água deionizada) no lugar da suspensão de USPIOs. Não foram realizados controles para o grupo experimental utilizando

50 mg/kg de USPIO para evitar o sacrifício de mais animais. Apenas por uma questão de rigor, um experimento foi realizado com um rato, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo usando uma dose de 10 mg/kg de peso corporal.

Microscopia Intravital

Os procedimentos descritos abaixo foram realizados para cada animal (um por vez) para a realização do estudo por microscopia intravital. Inicialmente, o animal foi anestesiado via intraperitoneal (i.p.) com cetamina/xilazina (75 mg/kg e 7,5 mg/kg, respectivamente) para dar início à canulação da veia femoral, procedimento necessário para a administração tanto das amostras (nanopartículas) quanto do anestésico (suplementação anestésica). A anestesia com cetamina/xilazina foi mantida durante todo o procedimento cirúrgico, com suplementações da anestesia por via intravenosa (10% da dose inicial) sempre que necessárias. O campo cirúrgico foi depilado e solução de álcool a 70% foi utilizada para assepsia local. Em seguida, foi feita a laparotomia medial, para exposição do mesentério e de seu leito vascular [116]. Durante este processo, o mesentério do animal anestesiado foi mantido sob hidratação com solução tampão Ringer-Locke contendo gelatina, com fluxo contínuo de 2 mL/min, sobre mesa aquecida a 37 °C. Neste instante foi iniciado o estudo da toxicidade via microscopia intravital com a aquisição dos dados necessários (contagem dos leucócitos, fluxo sanguíneo, pesquisa de hemorragias e/ou trombos). Primeiramente foram adquiridos dados do controle sem adição das nanopartículas (tempo zero). Logo em seguida os tratamentos foram administrados, por via i.v., e a cada 30 min foram coletados dados até totalizarem 120 minutos de estudo, incluindo o tempo zero, isto é, logo após a injeção das USPIOs. Para cada grupo (salina, USPIO), foi injetado 1 mL de solução em cada animal, sendo a solução salina o branco do experimento e a suspensão de USPIOs em tampão acetato

10 mM com NaCl 50 mM o grupo experimental. As medições foram realizadas a cada 30 minutos, incluindo o tempo zero que corresponde ao momento anterior à administração das amostras desejadas, totalizando 120 minutos. Os dados coletados foram contagem de leucócitos rolantes, aderidos e migrados, e o diâmetro da veia. Ao final, os animais foram sacrificados por administração de dose letal de anestésico (3 vezes a dose inicial). A morte foi confirmada pelo monitoramento da parada cardíaca e respiratória. É de se esperar que a dose escolhida de nanopartículas magnéticas não seja tóxica conforme Jain [117].

A toxicidade *in vivo* foi avaliada após administração intravenosa de 10 mg/kg de USPIOs em ratos machos Wistar. Esta dose mostrou ser adequada para comprovar a sua potencialidade como agente de contraste para IRM, bem como para avaliar a concentração induzida de nanopartículas pelo ímã para um local específico. Assim, foram avaliadas mudanças nos parâmetros da microcirculação, principalmente no que tange aos aspectos inflamatórios, na interação de leucócitos com células endoteliais (rolamento, adesão e migração), ou na formação de hemorragia e trombos, assim como o monitoramento do diâmetro venular, após a administração i.v. por microscopia intravital. A microcirculação mesentérica foi escolhida por causa da facilidade de monitoramento de todos aqueles parâmetros simultaneamente. A microcirculação hepática também foi observada, pois as imagens de ressonância magnética mostraram grande acúmulo de USPIOs nesse órgão.

Antes da exposição dos órgãos, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular (i.m.) contendo 75 mg/kg de cetamina e 7,5 mg/kg de xilazina, e uma cânula foi inserida na veia femoral para fazer a administração da USPIO e suplementação de anestésico (10 % da dose inicial) quando necessária. O campo cirúrgico foi raspado e álcool 70% v/v foi utilizado para assepsia local. Em seguida, uma laparotomia medial foi efetuada para expor o leito vascular do mesentério, que foi mantido hidratado com volumes de 2 mL/min de fluxo de solução de Locke-Ringer com tampão de gelatina (NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, 2 mM

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 NaHCO_3 mM, 5 mM de glicose e gelatina 1% [w/v], Synth, Diadema, SP, Brasil). Todos os procedimentos foram realizados sobre uma plataforma transparente especial aquecida a 37 °C, o que permite transiluminação do tecido. Todos os parâmetros medidos por microscopia intravital foram avaliados imediatamente antes (branco, $t = 0$ min), logo após ($t = 0$ min) e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração intravenosa de 10 mg/kg de USPIO disperso em 1 mL de tampão de acetato 10 mM contendo 50 mM de NaCl. A administração de 1 mL de solução salina e do veículo (tampão acetato) foram usados como controles.

A interação dos leucócitos com a camada endotelial das vênulas mesentéricas foi avaliada considerando-se o número de leucócitos aderidos e de rolamento no pós-capilar local (15-30 μm de diâmetro, 100 μm de comprimento). Os leucócitos que se deslocaram na periferia do fluxo axial, em contato com o endotélio, foram consideradas como sendo de rolamento, e o seu número determinado considerando-se um período de cinco minutos. O número de leucócitos aderidos ao endotélio (parado na parede do vaso durante pelo menos 30 segundos) foi determinado simultaneamente no mesmo segmento vascular. Leucócitos no exterior, mas dentro de uma área de 2.500 μm^2 ao lado das paredes dos vasos, foram contados como leucócitos migrados.

Depois de estudar a microcirculação mesentérica, o fígado foi exposto e as vênulas do lóbulo superior esquerdo visualizadas apenas após a injeção i.v. de solução de rodamina 6G 0,02% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), preparada por diluição (10x) em solução salina a partir de uma solução estoque 0,2% em água deionizada preparada imediatamente antes da utilização. O órgão foi umidificado com tampão de Locke-Ringer, e coberta com uma película de plástico para fins de inspeção. O número de leucócitos aderidos nos sinusóides (número de células que parou na parede do vaso por pelo menos 30 segundos) foi determinado como uma medida representativa dos efeitos inflamatórios no fígado. Avaliou-se o número médio coletado de pelo menos sete sinusóides para cada órgão por animal.

Todos os animais foram sacrificados após a realização dos experimentos através da administração i.v. de uma dose letal de anestésico (3 vezes maior do que a dose regular), e a morte confirmada pelo monitoramento da parada cardíaca e respiratória.

Imagens por transiluminação da microcirculação mesentérica foram obtidas por microscopia óptica usando um microscópio Axioplan II, equipado com lente Achroplan, abertura numérica da objetiva de 0,75 (Carl-Zeiss, Alemanha, ampliação máxima: 400x). O mesmo sistema de microscopia equipado com um acessório em modo de fluorescência, constituído por uma lâmpada de mercúrio HBO 100 e filtros de fluorescência, foi utilizado para capturar imagens de fluorescência dos microvasos hepáticos. Foi utilizado o acessório Axioplan Neofluar com distância longitudinal de 10x e abertura numérica da objetiva de 0,3 (100x de ampliação máxima Carl-Zeiss). As imagens coloridas foram capturadas com uma câmera CCD de vídeo colorida (AxioCam HRc, Carl Zeiss) conectada a um microcomputador, e, posteriormente, analisados por meio do software AxioVision (Carl-Zeiss).

Leucograma e Quantificação de Parâmetros Bioquímicos

Os animais foram anestesiados pela injeção de cetamina (88 mg/kg; Vetbrands, Jacareí, SP) associada a xilazina (8 mg/kg, via i.p.; Vetbrands, Jacareí, SP) antes dos ensaios para coleta do sangue circulante nas seguintes situações: antes da administração das USPIOs, duas horas e de uma a cinco semanas após a administração das USPIOs. Aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado com anticoagulante (EDTA) obtido da artéria femoral, para determinação da leucometria. A contagem total de células foi realizada em hemocitômetro, após a diluição das amostras de sangue na proporção de 1:20 (v:v) com líquido de Türk. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços de sangue corados com corante rápido Panótico que se baseia no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky.

O sangue total coletado foi utilizado para quantificação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos. Após coleta do sangue, o plasma foi isolado por centrifugação (10 minutos, 3500 rpm) e armazenado a -80 °C para as determinações no equipamento Labmax 240® (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais). Foram quantificados alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina, por método enzimático utilizando kits comerciais, de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante (Labtest®).

Os ratos foram anestesiados com injeção IP de 75 mg/kg de cetamina e 7,5 mg/kg de xilazina, e 1 ml de sangue foi coletado da veia femoral com heparina (5.000 UI/mL; Hepamax-S®, Blausiegel, Brasil) como anticoagulante para realizar a contagem dos leucócitos. As amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes, duas horas, e 1 a 4 semanas após a administração de USPIO. As contagens celulares totais foram realizadas utilizando-se um hemocitômetro (Herka, Berlim, Alemanha). Leucometrias diferenciais foram realizados em esfregaços de sangue corados com o corante de Romanowsky (Panótico®; fornecidos pela LABORCLIN, Brasil). Todo o sangue foi usado para a quantificação dos parâmetros bioquímicos, enzimáticos e hepáticos, como descrito abaixo.

O plasma do sangue total foi isolado por centrifugação (3.500 rpm, 10 min), armazenadas a -80° C e analisados utilizando um equipamento LabMax 240® (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina plasmática e da urina foram quantificadas através de kits comerciais adquiridos de Labtest®, seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante.

Dosagem de Ferro na Urina dos Ratos

Para finalizar, foi realizada a dosagem de ferro na urina dos mesmos ratos via espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite e amostrador automático de solução (GF-AAS). O grupo controle corresponde aos três ratos que receberam

2 mg de USPIOs e o grupo experimental recebeu a mesma quantidade de USPIOs, mas na presença de imã afixado na coxa do animal por duas horas. Essas amostras foram coletadas pela compressão da bexiga do animal sob efeito da anestesia, momentos antes de iniciar as varreduras de IRM, resultando em sete amostras para cada animal (tempo zero até 28 dias) que foram mantidas a -80°C até sua utilização.

O programa de aquecimento do forno está descrito na **Tabela 7** abaixo. Cada amostra foi preparada pela adição de 20 μg de Pd (modificador químico) e diluída 10x com solução de ácido nítrico 1%. O volume de amostragem foi de 10 μL utilizando-se um pipetador automático.

As amostras de urina foram coletadas antes da realização dos exames de ressonância magnética através de uma leve compressão na região da bexiga dos ratos Wistar anestesiados. As amostras foram coletadas de cada animal nos mesmos dias em que foram registradas as imagens de IRM, e armazenadas a -80°C até a análise. O teor de ferro total foi determinado utilizando um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS), modelo SIMAA-6000® (Perkin Elmer Vida e Ciências Analíticas, Shelton, CT, EUA), equipado com um fundo corretor longitudinal por efeito Zeeman, policromador óptico Echelle, tubo THGA padrão com plataforma piroliticamente revestida integrada, e detector de estado sólido. Uma lâmpada de catodo oco de ferro foi utilizada como fonte de luz e foram adotados os seguintes parâmetros instrumentais: $\lambda = 248,3 \text{ nm}$, corrente da lâmpada = 20 mA, e largura da fenda = 0,7 mm. Um auto-amostrador AS-72 (Perkin-Elmer) de líquidos foi utilizado para distribuir quantidades reprodutíveis das amostras para dentro do forno de grafite para reduzir o erro de amostragem. Gás argônio 99,998% v/v (Air Liquide Brasil, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como gás de proteção e transporte. As análises foram realizadas utilizando 10 μL das soluções de calibração e das amostras, co-injetadas com 10 μL de 20 mg de Pd ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) como modificador químico. Foram preparadas

amostras de urina através da sua diluição (10x) com ácido nítrico a 1% v/v. Uma curva de calibração foi plotada a partir do branco (1% v/v HNO₃) até 50 µg/L de Fe(III) por meio da diluição de uma solução de 1000 mg/L de padrão de Fe(III) (Titrisol © Merck, Darmstadt, Alemanha) em 1 % v/v de HNO₃. A correlação linear foi melhor do que 0.999 nessa faixa de concentração. Os parâmetros utilizados no programa de aquecimento GF-AAS utilizado para a análise de urina são listados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF-AAS) utilizado para detecção de ferro na urina dos ratos

Etapas	Temperatura / °C	Rampa / s	Patamar / s
Secagem	100	5	10
Atomização	2200	0	5
Limpeza	2400	1	3

A curva de calibração foi obtida utilizando soluções-padrão de íons ferro(III) variando de zero a 50 µg/L, cujo coeficiente de correlação linear foi de 0,9998.

Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média±d.p.m. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinados por análise de duas vias de variância (ANOVA) e aplicação do teste post-hoc de Tukey implementado no software Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). A significância estatística foi fixada em P <0,05.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Caracterização das Nanopartículas Superparamagnéticas

Dentre os diversos nanomateriais magnéticos, os óxidos de ferro se destacam pela grande disponibilidade de matéria-prima, baixo custo, facilidade de preparação e estabilidade. Basicamente, há dois óxidos de maior interesse: magnetita (Fe_3O_4) e maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A magnetita possui em sua composição íons Fe^{3+} e Fe^{2+} na proporção de 2:1, sendo estável na faixa de pH entre 8 e 14, em ambientes não oxidantes. Em meio oxidante, pH baixo ou processos eletroquímicos podem levar a conversão de magnetita à maguemita.

A magnetita possui uma estrutura cúbica de espinélio invertido conforme ilustrado na **Figura 54**, que confere ao material um comportamento ferrimagnético. A célula unitária é composta por 24 átomos de ferro e 32 átomos de oxigênio, e a dimensão lateral é 8,397 Å [118]. Os átomos de ferro tetraédrico formam o retículo cúbico de face centrada (fcc) e ocupam outras duas posições sub-reticulares, em sítios tetraédricos (Fe^{tet}) e octaédricos (Fe^{oct}). Os átomos de oxigênio encontram-se coordenados aos íons de ferro completando a estrutura. Em seu estado fundamental, os íons férricos (Fe^{3+}) ocupam os sítios tetraédricos e parte dos sítios octaédricos, enquanto que os íons ferrosos (Fe^{2+}) estão distribuídos nos sítios octaédricos do sub-retículo cristalino.

Figura 54: Representação estrutural da célula unitária da magnetita (Fe_3O_4), um espinélio cúbico de face centrada (fcc) (a). Ampliação do arranjo sub-reticular mostrando um sítio tetraédrico compartilhando um dos átomos de oxigênio com um sítio octaédrico (b). Adaptado de [118].

Os íons Fe^{3+} nos sítios tetraédricos e octaédricos apresentam estado de spin $S = 5/2$ ($5 \mu_B$), onde μ_B é o magneton de Bohr, e os íons Fe^{2+} nos sítios octaédricos possuem spin $S = 2$ ($4 \mu_B$), conforme ilustrado na **Figura 55**. O momento magnético dos sítios octaédricos e tetraédricos estão alinhados antiparalelamente entre si e resultam em uma magnetização $5 \mu_B$ ($\text{Fe}^{\text{oct}} + 4 \mu_B (\text{Fe}^{\text{oct}}) - 5 \mu_B (\text{Fe}^{\text{tet}}) = 4 \mu_B$, que é consistente com o resultado experimental de $4,07 \mu_B$ [119]. Estas estruturas podem ser melhores descritas como $[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ (magnetita) e $0,75[\text{Fe}^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}^{3+}_{5/3}\text{V}_{1/3}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ (maguemita), onde V = vacância de cátions.

Figura 55: Arranjo antiparalelo dos spins nos sítios octaédricos e tetraédricos da magnetita, mostrando o cancelamento dos momentos magnéticos dos íons Fe^{3+} , restando somente a contribuição dos íons Fe^{2+} .

Os íons ferro presentes na superfície das nanopartículas de óxido de ferro podem se ligar a moléculas com pares de elétrons disponíveis para coordenação. Assim, em meio aquoso, a superfície está funcionalizada por grupos hidroxila, que podem ser protonados ou desprotonados. Ou seja, dependendo do pH do meio a superfície pode estar positiva ou negativamente carregada, sendo o ponto isoelétrico observado em torno de pH 6,8. As propriedades de ligação da superfície podem ser utilizadas para promover sua funcionalização e a estabilização das nanopartículas. Por exemplo, por meio da ligação de moléculas com grupos funcionais positiva ou negativamente carregados, bem como grupos que aumentam a repulsão estérica. Além disso, outros grupos funcionais podem ser introduzidos de modo a ajustar as propriedades conforme a aplicação desejada, como por exemplo, a ligação de biomoléculas com capacidade de reconhecimento molecular, do tipo antígeno-anticorpo, visando aplicações biomédicas.

As nanopartículas utilizadas nos estudos aqui apresentados foram preparadas pelo método de decomposição térmica e funcionalizadas com grupos aminoetilfosfato como

apresentado na síntese, e podem ser prontamente dispersadas em água deionizada. É claro que esse processo é facilitado quando o grupo amina está protonado. Por isso tampão acetato 10 mM com NaCl 50 mM em pH 4 foi usado como meio dispersante das nanopartículas. O núcleo de magnetita apresenta tamanho médio de cerca de 7 nm conforme mostrado nas caracterizações abaixo. Assim, são nanopartículas superparamagnéticas, mas em inglês são comumente denominadas *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles* (USPIOs).

O histograma de distribuição de tamanho das USPIOs funcionalizadas com aminoetilfosfato obtido por DLS é mostrado na **Figura 56A**. Observa-se uma distribuição monomodal de tamanhos de partículas, com diâmetro médio hidrodinâmico de 11,32 nm e desvio padrão de 0,57 nm. A carga superficial obtida por medidas de potencial- ζ foi de +68,3 mV, indicando uma excelente estabilidade da dispersão em água.

A **Figura 56B** mostra o resultado de espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS) da mesma amostra onde observa-se um perfil de distribuição monomodal de tamanhos com diâmetro médio de 7,8 nm.

Figura 56: A) DLS e B) SAXS da amostra de USPIOs funcionalizadas com aminoetilfosfato.

A **Figura 57** mostra imagens de MET da amostra de USPIOs e seu respectivo histograma de distribuição de tamanho. Esta foi preparada aplicando-se uma alíquota da suspensão aquosa diluída das USPIOs numa rede de cobre coberta com um filme de carbono. Nesta condição, as nanopartículas hidrofílicas tendem a aglomerar-se, como mostrado na **Figura 57A**, devido à sua baixa afinidade com o substrato hidrofóbico e à formação de ligações de hidrogênio que propiciam a ligação entre as USPIOs através dos grupos amino terminais presentes em sua superfície. Mesmo assim, é possível notar a presença de nanopartículas facetadas, com morfologia quase-esféricas e de distribuição estreita de tamanho de $6,4 \pm 0,91$ nm, altamente cristalinas.

O histograma mostrou um perfil de distribuição de tamanhos bem estreito característico (**Figura 57B**), resultado da análise de um número suficientemente grande de partículas (mais de cem). O elevado grau de cristalinidade é evidenciado na imagem de alta resolução mostrada nas **Figuras 57C e D**, em que os planos cristalinos característicos da magnetita podem ser vistos claramente através dos planos de difração do nanocristal em diferentes projeções, podendo ser calculadas as distâncias dos planos e correlacionadas com as projeções esperadas para a magnetita, destacando-se, em especial, os planos (220), (111) e (311).

Figura 57: A) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de USPIOs funcionalizadas com aminoetilfosfato; B) o histograma de distribuição de tamanho correspondente; e C-D) imagens de MET de alta resolução mostrando as distâncias interplanares (220), (111) e (311) características de nanocristais de magnetita.

Além disso, a análise por DLS das USPIOs dispersas em água também mostrou uma distribuição monomodal, com tamanho médio de 11,32 nm e consistente com o perfil acima descrito (histograma da imagem de MET). Mas neste caso, o tamanho médio um pouco maior é esperado uma vez que as medidas de MET evidenciam apenas o tamanho do núcleo de magnetita enquanto que o DLS capta o raio hidrodinâmico, ou seja, a soma da dimensão do núcleo e da espessura da camada de proteção molecular (ligantes), bem como as duplas camadas eléctricas e de solvatação.

As imagens MET também revelaram o elevado grau de cristalinidade das nanopartículas por meio da presença de franjas de difração, mesmo muito próximo às bordas das nanopartículas que se encontram em foco. Essa característica é responsável pela elevada

magnetização de cerca de 60 emu/g observado para amostras sólidas de nanopartículas de magnetita funcionalizadas com grupos aminoetilfosfato.

A **Figura 58** mostra o padrão de difração de raio-X obtido a partir da amostra sólida. Todos os picos podem ser correlacionados e indexados com os picos de difração da estrutura cristalina cúbica de face centrada da magnetita, pertencente ao grupo de simetria Fd3m. Contudo, o pico em 37,4 graus atribuído à faceta 222 encontra-se sobreposto ao pico em 35,7 graus. De fato, este pico possui a menor intensidade na magnetita, cerca de 8%, e sua sobreposição é favorecida pelo alargamento dos picos de difração do nanomaterial, devido ao pequeno tamanho dos cristalitos. Os tamanhos das nanopartículas podem ser estimados através do alargamento dos picos de difração no difratograma através da equação de Debye-Scherrer. O diâmetro médio obtido pelo ajuste dos picos no difratograma foi de $6,60 \pm 0,92$ nm.

Figura 58: Difratograma de raio-X da amostra das USPIOs. O triângulo indica a presença do pico de 35,7 graus também referente à magnetita.

A **Figura 59A** mostra o espectro Raman obtido a partir da amostra sólida das USPIOs. O espectro mostra a presença de três picos principais em 668, 538 e 306 cm^{-1} atribuídos às bandas A_{1g} , T_{2g} e E_g da magnetita.

A **Figura 59B** mostra o espectro eletrônico Vis/NIR da amostra de USPIO dispersa em água. Pode-se observar um comportamento típico de espalhamento de luz causado por nanopartículas em dispersão coloidal no espectro com um maior espalhamento na região de menor comprimento de onda que diminui bruscamente em função do comprimento de onda. Na região de menor energia observa-se a presença de uma banda alargada, que estende-se a partir de 700 nm até valores acima de 1400 nm. Essa banda é atribuída a transição de transferência de carga de intervalência entre os sítios de Fe^{2+} e Fe^{3+} adjacente na magnetita, estando ausente nos demais óxidos como a maguemita e hematita.

Figura 59: (A) Espectro Raman da USPIO em estado sólido (pó) e (B) espectro visível/NIR da USPIO dispersa em água.

A **Figura 60** mostra os espectros infravermelho do ligante aminoetilfosfato (PEA) e da USPIO funcionalizada correspondente. O espectro vibracional da amostra do nanomaterial é caracterizado pela presença de bandas intensas na região de 1300 a 900 cm^{-1} atribuídas aos modos de estiramento das ligações P-O presentes no aminoetilfosfato. Estas bandas

encontram-se bastante deslocadas em relação ao ligante livre indicando sua participação na ligação com a superfície do óxido. A banda em 584 cm^{-1} é característica do estiramento Fe-O da magnetita e atribuída ao modo vibracional T_{1u} . As bandas alargadas na região de 3500 a 2500 cm^{-1} são atribuídas aos modos de estiramento das ligações O-H e N-H, presentes na superfície do óxido e na molécula protetora, respectivamente.

Figura 60: Espectro infravermelho (IV) da molécula protetora livre PEA (acima) e da USPIO funcionalizada (abaixo) com PEA.

A amostra de USPIO foi submetida a análise elementar, fluorescência de raio-X por energia dispersiva e espectroscopia de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado. Os resultados de microanálise no nanomaterial revelou a presença de 5,18%C, 2,21% H e 1,74%N. Considerando que a presença de Carbono e de Nitrogênio são devido ao PEA de fórmula $C_2H_8O_4NP$ coordenado à superfície das nanopartículas, foi calculado a composição percentual de 79% de Fe_3O_4 e 21% do ligante $C_2H_8O_4NP$. O resultado de EDX determinou uma proporção de Fe (proveniente apenas do núcleo da partícula) e P

(proveniente apenas do ligante) compatível com a composição percentual de 86% de Fe_3O_4 e 14% do ligante $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_4\text{NP}$. O resultado de ICP-OES revelou a presença de 58,9 g de Fe por 100g do nanomaterial que corresponde a uma composição percentual de 81% de Fe_3O_4 e 19% do ligante $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_4\text{NP}$.

Os nanomateriais com base em óxidos de ferro são interessantes para aplicações biomédicas porque exibem baixa toxicidade, as matérias-primas são abundantes e baratas, além da sua síntese ser relativamente simples. Entre todos os tipos de óxidos de ferro encontrados naturalmente, a magnetita (Fe_3O_4) e a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são os mais utilizados como agentes de contraste em IRM e para o desenvolvimento de novos nanomateriais para diagnóstico e tratamento de doenças.

Idealmente, para as nanopartículas magnéticas serem aplicadas como agentes de contraste em IRM, estas devem exibir um comportamento superparamagnético, e induzir a maior mudança possível em T_2 . Nanopartículas bem pequenas são vantajosas para esta finalidade, pois exibem alto poder de resolução na técnica e estabilidade coloidal, particularmente nanopartículas ultra-pequenas (USPIO) com diâmetro médio menor do que 10 nm. Além disso, eles devem ser totalmente dispersáveis em água e em meio biológico, ser biocompatível, causar resposta tóxica e imunológica mínimas, e devem apresentar grupos químicos em sua superfície para reagir posteriormente com biomoléculas, tais como anticorpos e outras proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e peptídeos.

Nanopartículas superparamagnéticas de magnetita perturbam o campo magnético externo, diminuindo os tempos de relaxação dos spins nucleares magnéticos T_2 e T_2^* por dispersão do conjunto de spins magnéticos no plano de precessão perpendicular ao campo magnético externo aplicado. Isso diminui as constantes de tempo de Ressonância Magnética Nuclear e as respectivas intensidades de sinais IRM. Assim, a presença de USPIO diminui a

intensidade de branco dos pixels (contraste negativo em IRM) na imagem final, ou seja, escurece as regiões onde estão presentes em concentrações suficientemente elevadas.

A **Figura 61** apresenta a curva de magnetização da USPIO obtida em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM) e esta comporta-se tipicamente como um material superparamagnético. A curva de magnetização apresenta a resposta da densidade de fluxo (B) ou magnetização (M) do material frente ao aumento controlado da intensidade do campo magnético ou excitação magnética H (de -20 a 20 kOe) sobre o material. Em nanopartículas suficientemente pequenas, a direção da magnetização pode variar aleatoriamente sob a influência da temperatura. O tempo normal entre dois “flips” é chamado de tempo de relaxamento de Néel. Na ausência de um campo magnético externo, quando o tempo de medida da magnetização das nanopartículas é muito maior do que o tempo de relaxação de Néel, a magnetização média é zero e essas partículas são consideradas superparamagnéticas. Neste estado, um campo magnético externo é capaz de magnetizar as nanopartículas, de forma semelhante a um material paramagnético. No entanto, a sua susceptibilidade magnética é muito maior do que a desses materiais.

Figura 61: Curva de magnetização da USPIO obtida em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM). Perfil de uma amostra superparamagnética.

2.4.2. Imagem por Ressonância Magnética e USPIOs

2.4.2.1. USPIOs como agentes de contraste em IRM

Uma sequência típica de imagens de ressonância magnética de um rato é mostrada nas **Figuras 62 e 63**. Note que as fatias do controle, dos rins (círculos amarelos na **Figura 62A**), e também do fígado e do baço (retângulo amarelo na **Figura 62A**), aparecem como regiões claras. A região inferior e lateral da cavidade abdominal aparece como uma região mais escura, devido à presença de ar no seu interior ou entre os órgãos. Assim, intestinos e pulmões também aparecem como áreas escuras devido ao ar presente em seu interior. No entanto, após a injeção de USPIO, há um aumento das áreas escuras na cavidade abdominal superior, onde estão presentes os rins (**Figura 62A**), o fígado e também o baço (**Figura 63**). No entanto, não há outros órgãos que parecem acumular nanopartículas de magnetita. A injeção foi feita através da canulação da veia femoral, onde a injeção da suspensão do material foi feita durante 10 minutos para evitar qualquer dano causado pela rápida injeção (mudança de pressão) ou concentração local elevada da magnetita.

A **Figura 62A** mostra também um forte contraste negativo no córtex renal (círculos amarelos) duas horas após a injeção de 50 mg/kg de USPIO, biodistribuição natural esperada devido à filtração renal. Este contraste começa a perder intensidade após 24 horas da injeção, indicando uma eliminação relativamente rápida desse órgão. Este efeito é mostrado quantitativamente na **Figura 62B**, onde a densidade média normalizada de pixels brancos nos rins é representada em função do tempo, mostrando a diminuição de nanopartículas de magnetita em cerca da metade da sua concentração inicial após 24 horas. No entanto, a intensidade do sinal de IRM é um valor relativo. Assim, a densidade média dos pixels brancos nos testículos foi utilizado como controle relativo para normalizar cada imagem, antes de

calcular a densidade média de pixels brancos nos rins. Não há evidência de acumulação de USPIOs nos testículos. A barra de erro representada no gráfico corresponde ao desvio padrão.

Figura 62: A) Típica série de imagens de ressonância magnética de um rato Wistar macho após administração i.v. de 50 mg/kg de USPIO, destacando a variação da densidade dos pixels brancos nos rins, indicados por círculos amarelos. A imagem da esquerda foi tirada antes da injeção de USPIO (controle), e, em seguida, depois de 2, 4 e 24 horas após a injeção. A cabeça do rato está apontando para cima. B) Média de densidade normalizada de pixels brancos de quatro verificações subsequentes dos rins em função do tempo após administração i.v. de 50 mg/kg de USPIOs (concentração é inversamente proporcional à densidade de pixels brancos em sinais de ressonância magnética).

O processo de eliminação mostrou-se ainda mais rápido após a injeção de 10 mg/kg de USPIO (**Figura 63**), indicando que o tempo de eliminação é dependente da dose. Os rins são

os principais órgãos responsáveis pela filtração e remoção de substâncias indesejáveis presentes no sangue. A filtração ocorre nos néfrons localizados no córtex renal (região da borda), onde aparece claramente o contraste negativo na imagem de ressonância magnética. Estas nanopartículas magnéticas no sangue são suficientemente pequenas para atravessar os capilares dos glomérulos para a cápsula de Bowman, a partir de onde são então enviadas à bexiga e mais ou menos rapidamente eliminadas do corpo pela urina. Nossos resultados indicam que as USPIOs são capazes de circular nos vasos sanguíneos até serem filtradas e excretadas pelos rins num processo relativamente rápido, tal como demonstrado nesse estudo de ressonância magnética (**Figura 62**).

Figura 63: *Típica série de imagens de ressonância magnética de um rato Wistar macho tratado com 10 mg/kg de USPIOs em função do tempo a partir de zero (momento da administração) até 28 dias após a administração IV, destacando o contraste no fígado e baço. O fígado e o baço estão indicados por um retângulo amarelo, e os círculos amarelos indicam os rins. As imagens em A) correspondem ao grupo controle (sem magneto) e em B) ao grupo experimental (com magneto).*

Por outro lado, cerca de um a quatro meses foram necessários para eliminar completamente, respectivamente, 10 (**Figura 63**) e 50 mg/kg (retângulos amarelos na **Figura 64**) de USPIOs do fígado, o órgão responsável pela desintoxicação do organismo através dos hepatócitos, que são conhecidos por acumularem ferro(III) na ferritina ou hemossiderina. A

quantidade de USPIOs acumulada no fígado após a injeção de 10 mg/kg começou a mostrar alguma diminuição do contraste negativo após duas semanas. Já 60 dias foram necessários para observar um efeito semelhante nos ratos Wistar machos que receberam a dose mais elevada. Antes destes períodos, a concentração de USPIO provavelmente era demasiadamente elevada para que as variações no nível de contraste negativo pudessem ser observadas. Mesmo neste caso desfavorável de acumulação no órgão, todos os ratos utilizados nos experimentos sobreviveram e não mostraram alteração em seu comportamento, indicando ausência de toxicidade, boa tolerância e eliminação total das nanopartículas de magnetita em função do tempo, mesmo utilizando-se uma dose tão elevada quanto 50 mg/kg. Proporcionalmente, um humano adulto de 70 kg receberia uma dose de 3,5 g de USPIO, uma dose muito mais alta do que a necessária para os diagnósticos por IRM (tipicamente, 0,16-0,24 mg de Fe_3O_4 , ou seja, 10-15 pmol de Fe/kg de peso corporal). No entanto, a dose de 10 mg/kg é comumente utilizado em estudos de IRM com ratos, utilizando SPIOs como agentes de contraste.

Figura 64: Típica série de imagens de ressonância magnética de um rato Wistar macho tratado com 50 mg/kg de USPIOs em função do tempo a partir de zero até 140 dias após a administração i.v., destacando o contraste no fígado e baço (retângulos amarelos). O contraste negativo na coxa esquerda é devido à acumulação de USPIOs induzida por um ímã fixado neste local por duas horas após a injeção i.v.. O fígado e o baço são indicadas por um retângulo amarelo, e um círculo azul indica o contraste negativo na coxa.

O efeito de contraste negativo elevado e durável no fígado por IRM indica um tempo de retenção muito maior das USPIOs neste órgão em relação aos rins. Esse órgão é conhecido por estocar ferro(III) para a produção posterior de transferrina, uma proteína responsável pelo transporte e distribuição de ferro(III) para todas as células do corpo, especialmente para a medula óssea visando a produção de hemoglobina e citocromos, conforme necessário. As

propriedades paramagnéticas do material presente no fígado são irrevogavelmente evidenciadas pela presença do contraste negativo. No entanto, não há nenhuma evidência clara de que as nanopartículas de magnetita mantiveram-se como tal, ou foram oxidadas a maguemita (também superparamagnética) ou dissolvida e armazenada como óxidos de ferro(III) paramagnético. No entanto, a possibilidade de dissolução espontânea das nanopartículas gerando íons de ferro(III) livres muito tóxicos pode ser descartada, considerando-se a ausência de toxicidade, a baixa solubilidade desses óxidos de ferro e a presença de proteínas com muitos sítios ativos de elevada afinidade pelo ferro(III), tais como ferritina e hemosiderina. Provavelmente, USPIOs estão sendo internalizadas pelas células (fagocitadas ou endocitadas) do sistema retículo-endotelial (RES) do fígado (principalmente células endoteliais e de Kupffer) e compartimentalizadas dentro dos lisossomos, onde são lixiviadas com o tempo devido ao baixo pH (3,5-4,0). Os produtos de degradação, ferritina e hemosiderina, permanecem retidas no interior das células e também causam um contraste negativo nas imagens de IRM, mas com eficiência 10 vezes menor que as USPIOs. Esse comportamento poderia explicar a manutenção do contraste negativo por um longo período de tempo.

2.4.2.2. Magneto-Direcionamento de USPIOs

Para comprovar o potencial de acumulação magnética induzida de USPIO em locais de interesse no animal, foi realizado um experimento de modo semelhante ao descrito anteriormente visando o estudo como agentes de contraste em IRM, exceto que foi fixado um ímã na coxa esquerda de um grupo de três animais imediatamente antes da administração i.v. de USPIO pela canulação na veia femoral direita, e ali mantido durante 2 horas. Nota-se um mancha com contraste negativo na coxa esquerda (círculo azul) na imagem de IRM, confirmando que as nanopartículas catiônicas fluíram ao longo do sistema circulatório e

eventualmente atingindo o local de onde foram magneticamente retidas (**Figura 65**). A vantagem de usar nanopartículas ultra-pequenas é que estas circulam no sangue por mais tempo do que as partículas com maior diâmetro hidrodinâmico, aumentando a quantidade acumulada magneticamente na região.

Na verdade, USPIOs exibiram uma relaxatividade bem alta de $178 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ em 0,47 T, um valor quase duas vezes maior do que produtos similares disponíveis no mercado, tais como Resovist® ($94 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ em 0,47 T) e Endorem® ($107 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ em 0,47 T), como mostrado na **Tabela 8**. O agente de contraste molecular gadolínio-DTPA (Magnevist®, $1,95 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ em 0,94 T), o agente de contraste mais utilizado em todo o mundo, exibe uma relaxatividade 90 vezes menor do que a USPIO aqui apresentada. Isso significa que é mais eficiente como agente de contraste, e as imagens de IRM podem ser obtidas com doses pequenas de nanopartículas, de forma muito mais segura para aplicações biológicas.

Figura 65: Típica série de imagens de ressonância magnética de um rato Wistar macho tratado com 50 mg/kg de USPIO em função do tempo a partir de zero até 140 dias após a injeção i.v., confirmando a acumulação induzida por ímã de USPIOs na coxa esquerda por um ímã colocado no local durante duas horas (círculo azul). O contraste negativo mostrado na coxa direita (círculo amarelo) é devido a subsequente administração intramuscular de 15 mg/kg de USPIO.

Tabela 8: Valores de relaxatividade da USPIO em comparação com as SPIOs comerciais usadas como agentes de contraste em IRM. Nota: a relaxatividade é proporcional ao campo magnético aplicado.

Amostra	Principal uso	Tamanho (nm)	Relaxatividade ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
USPIO	T_2	7	$R_2 = 178$ (0.47 T)
Resovist® ^a	T_2 -agents	62	$R_2 = 188$ (0.94 T)
Endorem® ^b	T_2 -agents	58	$R_2 = 107$ (0.47 T)
Feridex® ^c	T_2 -agents	18 - 24	$R_2 = 35$ (0.47 T)
Sinerem® ^d	T_2 -agents	17 - 20	$R_2 = 53$ (0.47 T)
Magnevist® ^e	$T_{1,2}$ -agents	molecular	$R_2 = 3.9$ (0.94 T)

a. Carboxi-dextran SPIO SHU-555

b. Dextran SPIO AMI-25

c. Dextran SPIO MION 46L

d. Dextran SPIO

e. Gd-DTPA

Duas horas após a injeção i.v. de 50 mg/kg de USPIOs com um magneto colocado junto a parte externa da coxa esquerda (círculos azuis na **Figura 65**), foi possível verificar a acumulação local de uma grande quantidade de nanopartículas, cuja eliminação completa demorou mais de 140 dias. Não há acúmulo esperado nesta região, como pode ser evidenciado pelo controle na figura (fatia à esquerda). Para fins comparativos, 15 mg/kg de USPIOs foram injetados intramuscularmente (IM) na coxa direita do animal. Pela imagem de IRM verifica-se a presença de uma mancha de contraste negativo realçada pelo círculo amarelo na figura. Estas nanopartículas desaparecem após cerca de 60 dias, enquanto que as nanopartículas magneticamente acumuladas precisam de mais de 140 dias, sugerindo que a via de administração modifica a interação das USPIOs com os tecidos musculares. Um longo tempo de retenção pode ser vantajoso para fins de tratamento de doenças, uma vez que uma dose única de USPIOs retida na região alvo não causou efeitos tóxicos significativos. Por exemplo, pode permitir o tratamento concomitante por hipertermia ou a liberação controlada de drogas.

Além disso, os ratos Wistar machos tratados com a menor dose de 10 mg/kg de USPIOs exibiram tempos de eliminação do fígado diferentes: 14 e 7 dias, na ausência e na presença do ímã afixado na coxa esquerda, respectivamente (**Figura 64B**). Os animais foram monitorados até 28 dias, sendo este o tempo necessário para eliminar completamente as USPIOs do organismo, como confirmado por IRM. Resultados reprodutíveis foram obtidos para os três ratos de cada grupo, e indicam claramente que a acumulação induzida de USPIOs por um ímã na coxa do animal diminui a quantidade de nanopartículas presentes na circulação sanguínea, reduzindo assim a quantidade retida por outros órgãos, tal como esperado.

Considerando-se o tempo de eliminação relativamente longo, não se pode acreditar que as nanopartículas de magnetita foram simplesmente retidas no interior das veias e vasos pela presença do campo, porque neste caso seriam redispersas pelo fluxo sanguíneo assim que o ímã fosse removido. Assim, acreditamos que as USPIOs cruzaram o endotélio dos vasos e penetraram nos tecidos musculares adjacentes, onde foram mais fortemente retidas. De fato, mostrou-se que 15 mg/kg de USPIOs administradas i.m. na coxa direita apresentaram contraste negativo em IRM semelhante ao obtido pelas nanopartículas concentradas por um campo magnético externo, mas levou cerca de 60 dias para desaparecer (**Figura 65**). Assim, as USPIOs provavelmente estão cruzando a parede dos vasos sanguíneos e se depositando no parênquima muscular. Alguns relatos na literatura reforçam essa hipótese. Thomsen e colaboradores [120] utilizaram um modelo *in vitro* para demonstrar que SPIOs podem ultrapassar a barreira hemato-encefálica, a barreira vascular mais restritiva do corpo humano. Além disso, foi mostrado *in vitro* que as SPIOs podem penetrar nas células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVECs).

2.4.3. Estudo da Toxicidade *In Vivo* das USPIOs

Apesar dos resultados muito encorajadores descritos acima, a aplicação de USPIOs como agentes de contraste para IRM seria limitada se causasse elevada toxicidade aguda nas condições normalmente utilizadas nos exames de IRM. Assim, amostras de sangue e de urina recolhidas dos mesmos grupos de animais utilizados nos experimentos de IRM, foram analisadas a fim de se determinar a contagem de leucócitos e outros parâmetros bioquímicos como dosagem de enzimas hepáticas e renais, e o teor de ferro na urina, em função do tempo após a administração i.v., como mostrado nas **Figuras 66 a 68**.

O número de leucócitos, neutrófilos e linfócitos (**Figura 66**) foi determinado nas amostras de sangue coletadas de seis ratos logo após os exames de ressonância magnética, usando um hemocítômetro. O número médio de leucócitos (**Figura 66A**) manteve-se constante em cerca de 5.000 células por mm^3 ao longo de 28 dias, tanto para o controle quanto para o grupo experimental de ratos ($n = 3$), após a administração de solução salina (veículo) ou de USPIOs, respectivamente. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) no número de linfócitos e neutrófilos após a injeção de soro fisiológico ou de USPIOs (**Figura 66B e 66C**). Portanto, não há qualquer alteração no número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos, mesmo após a administração de 10 mg/kg de USPIOs. Ali e colaboradores [121] também reportaram que ferrofluidos baseados em núcleo magnético de nanopartículas de óxido de ferro recoberta com poli(4-vinilpirrolidona) (P4VP) e revestida com polietileno glicol (PEG) não têm efeitos adversos sobre o hemograma completo (hemácias, leucócitos, plaquetas, hemoglobina e hematócrito) nem apresenta efeito hemolítico no sangue.

Figura 66: Número de leucócitos (A), linfócitos (B), e neutrófilos (C) presente em 1 mm³ de sangue antes da administração i.v. (zero), e em função do tempo até 28 dias após a administração intravenosa de 10 mg/kg de USPIOs em ratos Wistar machos (n = 3). Os controles são solução salina (n = 3) e veículo da solução (n = 3) (10 mM de tampão acetato pH 4,5). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os níveis de alanina-aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina no sangue e na urina foram dosados ao longo de 28 dias, e estão apresentadas na **Figura 67**. Essa dosagem foi realizada para avaliar o efeito tóxico que as USPIOs poderiam causar no fígado e nos rins, tanto na ausência quanto na presença do ímã. Não houve alteração significativa ao administrar i.v. o veículo (10 mM de acetato, pH 4,5) e a

suspensão de USPIOs tanto para o grupo controle (sem ímã) quanto para o experimental (com ímã) em relação à solução salina, com exceção de ALT nos dias 21 e 28. Entretanto, o nível de ALT é considerado normal até 80 U/L, sendo os valores encontrados na faixa de 25 a 50 U/L dentro da faixa aceitável.

Figura 67: Dosagem de enzimas hepáticas (ALT e AST em U/L) no sangue, ureia, creatinina do plasma (em mg/dL) e da urina de ratos Wistar machos tratados com 10 mg/kg de USPIO em função do tempo, até 28 dias após a injeção i.v.. Um magneto foi posto (experimental) ou não (controle) externamente à coxa esquerda de um grupo de ratos ($n = 3$) durante duas horas. Os controles são solução salina ($n = 3$) e veículo da solução ($n = 3$) (10 mM de tampão acetato pH 4,5). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ versus tratamento com salina respectivamente.

Figura 68: *Concentração de ferro ($[Fe]$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) determinada pelo GF-AAS na urina de ratos ($n = 3$) em função do tempo após a injeção intravenosa de 10 mg/kg de USPIOs. O grupo experimental ($n = 3$) refere-se àquele onde um magneto foi posto na parte externa da coxa esquerda do animal durante 2 horas, a fim de concentrar as nanopartículas de magnetita, enquanto o grupo controle se refere ao grupo sem o ímã.*

A fim de confirmar estes resultados *in vivo*, ensaios de microscopia intravital foram realizados na microcirculação hepática para obter uma estimativa mais direta de eventuais efeitos tóxicos de USPIOs neste órgão. Nenhuma inflamação (adesão de leucócitos), microhemorragias ou a formação de trombos foi observada nos sinusóides do fígado, tal como descrito em mais detalhe abaixo (**Figura 69**). Portanto, pode-se concluir que mesmo doses elevadas de USPIO não interferem nas funções do fígado.

A urina do grupo de ratos que receberam 10 mg/kg de USPIO, sem (controle, **Figura 68** em verde) e com (experimental, **Figura 68** em azul) um ímã na coxa esquerda durante duas horas, foi recolhida logo após as medidas de ressonância magnética e analisados por GF-AAS, uma técnica analítica muito sensível, capaz de medir concentrações abaixo de nanomolar. Pode-se notar que a concentração de ferro na urina aumentou significativamente duas horas após administração i.v. de USPIO e, em seguida, diminuiu progressivamente até 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ no grupo experimental (**Figura 68** em azul), indicando a completa eliminação da magnetita após 28 dias. Comportamento semelhante foi observado para o grupo controle (**Figura 68** em verde), mas o nível de ferro imediatamente após a injeção i.v. (duas horas) mostrou ser significativamente mais elevado do que no grupo experimental (528 $\mu\text{g}/\text{L}$, em comparação com 425 $\mu\text{g}/\text{L}$) e manteve-se estável ao redor de 200-300 $\mu\text{g}/\text{L}$, em contraste com os 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ alcançado pelo grupo experimental.

Deve-se lembrar neste ponto que a quantidade de nanopartículas de magnetita concentradas no fígado e no baço do grupo controle é mais elevada do que no grupo experimental de ratos. Além disso, a taxa de eliminação de USPIOs magneticamente

concentradas na coxa esquerda mostrou-se mais lenta em relação às que permaneceram nos órgãos internos. Considerando-se que o fígado pode efetivamente eliminar a magnetita, provavelmente, a quantidade extra de USPIOs retida pelo controle foi maior do que a concentração crítica, isto é, foi saturada a sua capacidade de processamento. Assim, o referido órgão deve trabalhar em sua capacidade máxima ao longo de 28 dias até, eventualmente, o valor tornar-se menor que esse limite e o teor de ferro na urina começar a diminuir exponencialmente da mesma maneira como no grupo experimental (**Figura 68B**). O excesso de ferro(III) também pode ser eliminado através das fezes.

O efeito das USPIOs na microcirculação pode ser avaliada *in vivo*, diretamente por microscopia intravital fluorescente, tal como mostrado na **Figura 69A**, onde as regiões escuras correspondem às vênulas e sinusóides, e as amarelas as regiões do parênquima hepático marcado com rodamina 6G. O mesentério e a microcirculação hepática são tecidos altamente vascularizados, amplamente utilizados para estudar a toxicidade de compostos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de leucócitos aderidos ao longo dos sinusóides hepáticos ao longo de 3 horas após a administração i.v. de USPIOs em comparação com animais-controle, onde injetou-se solução salina (**Figura 69B**). Da mesma forma, não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de leucócitos rolando ao longo do pavimento endotelial vascular das vênulas mesentéricas após a injeção de USPIOs, em comparação com os animais-controle (**Figura 70A**). O número de leucócitos aderidos e migrados na microcirculação mesentérica aumentou significativamente após 30 e 60 minutos da exposição do tecido, mas um comportamento semelhante foi observado nos controles com solução salina injetada (**Figura 70B e 70C**), não evidenciando toxicidade estatisticamente significativa induzida pela USPIO. Além disso, o diâmetro das vênulas permaneceu inalterado entre 20 e 24 mm (**Figura 70D**) evidenciando novamente a baixa ou nenhuma toxicidade das USPIOs para o sistema vascular. Em conclusão, os resultados obtidos

por microscopia intravital confirmaram a segurança das USPIOs em eventos tóxicos importantes, tais como a ativação de leucócitos, formação de trombos ou mudança no diâmetro vascular tanto no leito vascular do fígado quanto no mesentério após a injeção i.v.. A tendência insignificante das USPIOs interagirem com as membranas celulares carregadas negativamente na microcirculação pode ser um indicativo da formação de uma coroa de proteção de proteínas séricas presentes em alta concentração, provavelmente a albumina, imunoglobulinas e cadeias de fibrinogênio.

Figura 69: A) Imagens de microscopia intravital de fluorescência que mostra o número de leucócitos (marcados com rodamina 6G) aderidos aos sinusóides hepáticos 3 horas após a injeção intravenosa (1 mL, dose única) de solução salina (controle, imagem acima) e de 10 mg/kg da suspensão de USPIO (experimental, imagem abaixo). B) Número médio de leucócitos aderidos em segmentos de 100 mm de

paredes sinusoidais considerando pelo menos cinco sinusóides por rato. As setas brancas indicam leucócitos aderidos. A barra indica um comprimento de 100 μm .

Figura 70: Efeito das USPIOs sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do mesentério de ratos Wistar machos por microscopia intravital. O número de (A) rolamentos, (B) aderência e (C) migração leucocitária antes e 30-120 min após a administração i.v. estão indicados. (D) Diâmetro venular (μm) medido sob as mesmas condições e mesmos intervalos de tempo. Média obtida de 4 a 7 animais em cada grupo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

2.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Nanopartículas ultrapequenas (7 nm de diâmetro) superparamagnéticas de magnetita, funcionalizadas com etilamina (catiônicas) e totalmente dispersáveis em meio aquoso, demonstraram ser não-tóxicas e agentes de contraste muito eficientes para diagnóstico por Imagem por Ressonância Magnética (IRM). USPIOs administradas i.v. circulam livremente em todo o sistema vascular, sem retenção nos órgãos e nos tecidos, com exceção do fígado, baço, rins e bexiga, órgãos responsáveis pela eliminação de substâncias estranhas do corpo. 10 mg/kg de USPIOs foram eliminadas a partir dos rins e da bexiga de ratos Wistar machos em alguns dias, mas a eliminação completa do corpo ocorreu apenas após quatro semanas. O tempo de eliminação é dose-dependente e a toxicidade *in vivo* mostrou-se baixa. De fato, elas não causaram nenhum efeito sobre o número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos, assim como nos níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, ureia, creatinina no plasma e no sangue ao longo de 28 dias. O estudo *in vivo* por microscopia intravital confirmou sua baixa toxicidade, como demonstrado pelo efeito sobre o número de leucócitos aderidos, formação de microhemorragias e trombos, bem como sobre o diâmetro dos microvasos. A falta de interação das USPIOs com as paredes dos vasos sanguíneos sugere que eles interagem com biomoléculas presentes no sangue, gerando uma coroa, que também permite a retenção magnética induzida pelo ímã. A alta relaxatividade e toxicidade aguda insignificante torna as USPIOs candidatas em potencial para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e tratamento (teragnóstica) de várias doenças.

Capítulo 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através dos estudos de funcionalização e estabilização das nanopartículas de ouro conjugadas às biomoléculas, expostos na seção 1.3.2, demonstraram a viabilidade e potencialidade desses nanobioconjugados para o desenvolvimento de imunoenaios e de nanossensores com vistas ao diagnóstico de doenças de forma inovadora, explorando as propriedades químicas, físicas e biológicas, expostas na seção 1.1.2, das nanopartículas de ouro.

O ensaio de ELISA comprovou a funcionalidade dos anticorpos conjugados às nanopartículas de ouro e mostrou maior sensibilidade frente ao ensaio convencional, novamente endossando a importância do controle da orientação dos anticorpos nesses materiais na área de diagnósticos.

Toda esta potencialidade não teria fundamento se esses materiais fossem tóxicos, por isso testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, expostos na seção 1.3.4 e visando principalmente o sistema hematológico e microvascular, foram realizados. Demonstrou-se inexistir toxicidade aguda e, inclusive, descobriu-se uma propriedade anti-inflamatória que pode ensejar novos estudos e aplicações.

A otimização da disposição dos anticorpos na superfície das nanopartículas através da estratégia da proteína A ou de outros mecanismos mereceria mais estudos aprofundados, pois requerem ajuste das condições experimentais. Entretanto, embora desejável, esta ordenação não é um fator determinante para o sucesso da aplicação, pois até mesmo o nanobioconjugado mais simples mostrou-se mais eficaz do que o anticorpo livre, mas menos eficiente que aqueles com os anticorpos devidamente orientados expondo a fração *Fab* ou *F(ab')₂*.

De forma similar, as nanopartículas magnéticas baseadas em magnetita também mostraram-se promissoras no campo de diagnóstico por imagem. Devido às suas propriedades químicas, físicas e biológicas únicas, expostas na seção 2.1.2, comprovou-se sua potencialidade como eficiente agente de contraste em imagem por ressonância magnética

(IRM). Outro ponto explorado foi a possibilidade de concentrar magneticamente essas nanopartículas numa região de interesse diagnóstico e/ou terapêutico através de um gradiente de campo externo aplicado nessa região, confirmando sua potencialidade como plataforma para entrega direcionada de fármacos ou substâncias terapêuticas.

Toda esta potencialidade não teria fundamento se esses materiais fossem tóxicos. Por isso ensaios de toxicidade *in vivo*, expostos na seção 2.3.3, também foram realizados demonstrando a ausência de toxicidade aguda e sub-crônica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta tese, foram apresentadas e exploradas as propriedades exclusivas e interessantíssimas que tanto as nanopartículas de ouro quanto as magnéticas apresentam. Entretanto, de fato, pouco se explorou quanto às suas reais aplicações no campo de diagnóstico e tratamento de doenças (teragnóstica). Nesse sentido, essa linha de pesquisa será aprofundada e explorada visando a aplicação das nanopartículas na teragnóstica de câncer no estágio de pós-doutoramento.

Outro ponto fundamental é continuar investigando os efeitos tóxicos que esses materiais eventualmente podem apresentar. Por isso ensaios de toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* deverão ser realizados, principalmente em modelos de toxicidade crônica, pois na literatura há poucos relatos de como o organismo reagirá diante da administração continuada por desses materiais por longos períodos.

As propriedades e aplicações dessas nanopartículas estão sendo extensivamente exploradas desde a década de 1990, e atualmente carece-se de materiais inovadores que trarão novas perspectivas. Materiais resultantes da hibridização de dois ou mais componentes são interessantes [122], pois as propriedades individuais de cada um desses podem atuar

sinergicamente, podendo resultar em característica totalmente inesperadas e interessantes. Por exemplo o tempo do teste de ELISA, apresentado na seção 1.3.5., poderia ser minimizado caso fosse utilizado NBCs híbridos de AuNPs com SPIONs. As etapas de lavagem seriam muito mais rápidas utilizando-se a estratégia de separação magnética, o que seria uma grande vantagem comparado aos métodos tradicionais. Ensaio de interação AuNP-SPION foram iniciados durante a estadia da candidata na Universidade de Rutgers, NJ, EUA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liz-Marzán, L.M., *Nanometals: formation and color*. materialstoday, 2004. **7**(2): p. 26-31.
2. Jr., R.A.F. *Nanomedicine*. 1998-2006 2015/04/27]; Available from: <http://www.foresight.org/Nanomedicine/>.
3. Toma, S.H., et al., *Supramolecular Approach to Gold Nanoparticle/Triruthenium Cluster Hybrid Materials and Interfaces*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2011. **2011**(10): p. 1640-1648.
4. Daniel, M.C. and D. Astruc, *Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chemical Reviews, 2004. **104**(1): p. 293-346.
5. *Amazing Facts : The ancient Romans based on your viewing angle, the color change was a cup!* [cited 2015 2015/05/04]; Available from: <http://www.jazbalive.com/amazing-facts-the-ancient-romans-based-on-your-viewing-angle-the-color-change-was-a-cup/>.
6. Schmid, G. and B. Corain, *Nanoparticulated gold: Syntheses, structures, electronics, and reactivities*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2003. **2003**(17): p. 3081-3098.
7. Mirkin, C.A., et al., *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 607-609.
8. Elghanian, R., et al., *Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles*. Science, 1997. **277**(5329): p. 1078-1081.
9. Thaxton, C.S., et al., *Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines "undetectable" PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18437-42.
10. Zhao, X.J., et al., *A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(42): p. 15027-15032.
11. Schmid, G. and B. Corain, *Nanoparticulated gold: Syntheses, structures, electronics, and reactivities*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2003(17): p. 3081-3098.

12. Shukla, R., et al., *Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview*. Langmuir, 2005. **21**(23): p. 10644-10654.
13. Yen, H.-J., et al., *Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes*. Small, 2009. **5**(13): p. 1553-1561.
14. Wang, Z. and L. Ma, *Gold nanoparticle probes*. Coordination Chemistry Reviews, 2009. **253**(11-12): p. 1607-1618.
15. Park, K., et al., *New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(10): p. 1553-1566.
16. Fasciani, C., et al., *High-temperature organic reactions at room temperature using plasmon excitation: decomposition of dicumyl peroxide*. Org Lett, 2011. **13**(2): p. 204-7.
17. Pedersen, D.S., et al., *Toxicological aspects of injectable gold-hyaluronan combination as a treatment for neuroinflammation*. Histol Histopathol, 2014. **4**: p. 447-456.
18. Larsen, A., et al., *Gold ions bio-released from metallic gold particles reduce inflammation and apoptosis and increase the regenerative responses in focal brain injury*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(4): p. 681-692.
19. Gassmann, W., et al., *High-dose cytostatic agents in allogeneic bone marrow transplantation: comparison of the engraftment promoting potential*. Br J Haematol, 1991. **78**(3): p. 310-8.
20. Mie, G., *Beiträge zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen*. Annalen der Physik, 1908. **330**(3): p. 377-445.
21. Moores, A. and F. Goettmann, *The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications*. New Journal of Chemistry, 2006. **30**(8): p. 1121-1132.
22. Rosi, N.L. and C.A. Mirkin, *Nanostructures in biodiagnostics*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1547-1562.
23. Katz, E. and I. Willner, *Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications*. Angewandte Chemie-International Edition, 2004. **43**(45): p. 6042-6108.
24. Qiao, F.-Y., et al., *Antibody and DNA dual-labeled gold nanoparticles: Stability and reactivity*. Applied Surface Science, 2008. **254**(10): p. 2941-2946.
25. Wilson, R., *Haptenylated mercaptodextran-coated gold nanoparticles for biomolecular assays*. Chemical Communications, 2003(1): p. 108-109.
26. Hirsch, L.R., et al., *A whole blood immunoassay using gold nanoshells*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(10): p. 2377-2381.
27. Pissuwan, D., et al., *Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles*. Trends in Biotechnology, 2006. **24**(2): p. 62-67.
28. Cardinal, J., et al., *Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles*. Surgery, 2008. **144**(2): p. 125-132.
29. Felidj, N., et al., *Discrete dipole approximation for ultraviolet-visible extinction spectra simulation of silver and gold colloids*. Journal of Chemical Physics, 1999. **111**(3): p. 1195-1208.
30. Ma, Z.F. and S.F. Sui, *Naked-eye sensitive detection of immunoglobulin G by enlargement of an nanoparticles in vitro*. Angewandte Chemie-International Edition, 2002. **41**(12): p. 2176-2179.
31. Choi, J.-W., et al., *Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle-antibody complex*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **313-314**(0): p. 655-659.

32. Lin, C.-C., et al., *A new protein A assay based on Raman reporter labeled immunogold nanoparticles*. Biosensors & Bioelectronics, 2008. **24**(2): p. 178-183.
33. Grubisha, D.S., et al., *Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(21): p. 5936-5943.
34. Ambrosi, A., et al., *Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(14): p. 5232-5240.
35. Faulk, W.P. and G.M. Taylor, *An immunocolloid method for the electron microscope*. Immunochemistry, 1971. **8**(11): p. 1081-1083.
36. Liz-Marzan, L.M., *Nanometals: Formation and color*. Mater. Today, 2004. **7**(2): p. 26-31.
37. Grasseschi, D., et al., *Surface enhanced Raman scattering spot tests: a new insight on Feigl's analysis using gold nanoparticles*. Anal. Chem., 2010. **82**(22): p. 9146-9149.
38. Zamarion, V.M., et al., *Ultrasensitive SERS nanoprobe for hazardous metal ions based on trimercaptotriazine-modified gold nanoparticles*. Inorganic Chemistry, 2008. **47**(8): p. 2934-2936.
39. de Assis, D.N., et al., *Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99mTechnetium-fluconazole nanocapsules*. Int J Pharm, 2008. **349**(1-2): p. 152-160.
40. Bleher, R., et al., *Immuno-EM using colloidal metal nanoparticles and electron spectroscopic imaging for co-localization at high spatial resolution*. J Microsc, 2008. **230**(Pt 3): p. 388-395.
41. Forsgren, A. and J. Sjoquist, *"Protein A" from S. aureus. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin*. J Immunol, 1966. **97**(6): p. 822-827.
42. Stefan, M., et al., *Attenuated effects of chitosan-capped gold nanoparticles on LPS-induced toxicity in laboratory rats*. Mater Sci Eng, C, 2013. **33**(1): p. 550-556.
43. Pattan, G. and G. Kaul, *Health hazards associated with nanomaterials*. Toxicol. Ind. Health, 2012: p. 1-21.
44. Lauterwasser, C., *Opportunities and risks of nanotechnologies: small sizes that matter*, 2005, Allianz Group & Organisation for Economic Co-operation and Development.
45. Paino, I.M., et al., *Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells*. Toxicol. Lett., 2012. **215**(2): p. 119-125.
46. Siddiqi, N.J., et al., *Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains*. J. Neuroinflamm., 2012. **9**(123).
47. Sonavane, G., et al., *Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size*. Colloids Surf. B. Biointerfaces, 2008. **66**(2): p. 274-280.
48. Kong, B., et al., *Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles*. Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(5): p. 929-941.
49. Tarantola, M., et al., *Cytotoxicity of Metal and Semiconductor Nanoparticles Indicated by Cellular Micromotility*. Acs Nano, 2009. **3**(1): p. 213-222.
50. Goodman, C.M., et al., *Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains*. Bioconjugate Chemistry, 2004. **15**(4): p. 897-900.
51. Chithrani, B.D., et al., *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 662-668.
52. Connor, E.E., et al., *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. Small, 2005. **1**(3): p. 325-327.

53. Dragoni, S., et al., *Gold nanoparticles uptake and cytotoxicity assessed on rat liver precision-cut slices*. Toxicol Sci, 2012. **128**(1): p. 186-197.
54. Chen, H., et al., *In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e58208.
55. Khan, H.A., et al., *Transient increase in IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha gene expression in rat liver exposed to gold nanoparticles*. Genet Mol Res, 2013. **12**(4): p. 5851-5857.
56. Berger, M., *Adverse effects of IgG therapy*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2013. **1**(6): p. 558-566.
57. Enustun, B.V. and J. Turkevich, *Coagulation of colloidal gold*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(21): p. 3317-3328.
58. Turkevich, J., et al., *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discuss. Faraday Soc., 1951. **11**: p. 55-75.
59. Frens, G., *Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions*. Nature-Physical Science, 1973. **241**(105): p. 20-22.
60. Bonifacino, J.S., et al., *Current Protocols in Cell Biology*. 1st ed. Vol. 1. 2001: John Wiley & Sons, Inc. 16.0.1-16.5.22.
61. Harlow, E.L., D., *Antibodies: A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1988, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. Ao, L.M., et al., *Fluoroimmunoassay for antigen based on fluorescence quenching signal of gold nanoparticles*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(4): p. 1104-1106.
63. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968. **97**: p. 77-89.
64. Sharma, P. and J.D. Sharma, *In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity*. J. Ethnopharmacol., 2001. **74**(3): p. 239-243.
65. Giordano, R., et al., *Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of Trypanosoma cruzi having adhesive properties to laminin*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(6): p. 3461-3468.
66. Macedo, S.M., et al., *Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response*. Toxicology, 2006. **220**(2-3): p. 126-135.
67. de Lima, C.B., et al., *Actions of translocator protein ligands on neutrophil adhesion and motility induced by G-protein coupled receptor signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(2): p. 918-923.
68. Aranda, A., et al., *Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells*. Toxicol In Vitro, 2013. **27**(2): p. 954-63.
69. Liu, X., et al., *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **58**(1): p. 3-7.
70. Araki, K., et al., *Preparation of very reactive thiol-protected gold nanoparticles: revisiting the Brust-Schiffrin method*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2006. **6**(3): p. 708-712.
71. Mock, J.J., et al., *Distance-dependent plasmon resonant coupling between a gold nanoparticle and gold film*. Nano Letters, 2008. **8**(8): p. 2245-2252.
72. Roitt, I.M.D., P. J., *Roitt's Essential Immunology*. 10th ed. 2001: Blackwell.
73. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. 2008: Sara Tenner.

74. Society, A.E. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 05/10/2013]; Available from: http://www.aesociety.org/areas/one_de.php.
75. Erber, T. and G.M. Hockney, *Equilibrium configurations of N equal charges on a sphere*. Journal of Physics A: Mathematical and General, 1991. **24**(23): p. L1369.
76. Rahman, M., et al., *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*. 1 ed. Springer Series in Biophysics. 2013: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
77. Monopoli, M.P., et al., *Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(8): p. 2525-34.
78. Vroman, L., et al., *Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces*. Blood, 1980. **55**(1): p. 156-9.
79. Antônio Ramos, L.A., et al., *Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores*. Química Nova, 2006. **29**(5): p. 1114 - 1120.
80. He, Z., et al., *The unexpected effect of PEGylated gold nanoparticles on the primary function of erythrocytes*. Nanoscale, 2014. **6**(15): p. 9017-24.
81. Bkaily, G., et al., *Nuclear membranes Gpcrs: implication in cardiovascular health and diseases*. Curr Vasc Pharmacol, 2014.
82. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-175.
83. Cho, K.J., et al., *Bioactive lipoxxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species*. Mol Cells, 2011. **32**(1): p. 1-5.
84. Leonaviciene, L., et al., *Effect of gold nanoparticles in the treatment of established collagen arthritis in rats*. Medicina, 2012. **48**(2): p. 91-101.
85. Pereira, D.V., et al., *Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2012. **53**(13): p. 8036-8041.
86. Dulkeith, E., et al., *Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects*. Phys Rev Lett, 2002. **89**(20): p. 203002-203006.
87. Survey, U.S.G. *Iron Ore*. Mineral Commodity Summaries 2015 [cited 2015 2015/04/14]; Available from: http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/iron_ore/mcs-2015-feore.pdf.
88. Lu, A.H., et al., *Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(8): p. 1222-44.
89. Shao, H.L., et al., *Magnetic nanoparticles for biomedical NMR-based diagnostics*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2010. **1**: p. 142-154.
90. Uchiyama, M.K., et al., *Nanopartículas e seu uso como agente de contraste em imagem por ressonância magnética*, USP, Editor 2015: Brazil.
91. Haun, J.B., et al., *Magnetic nanoparticle biosensors*. Wiley Interdisciplinary Reviews- Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2010. **2**(3): p. 291-304.
92. Jia, C.P., et al., *Nano-ELISA for highly sensitive protein detection*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **24**(9): p. 2836-2841.
93. Cohen, Y. and S.Y. Shoushan, *Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics*. Current Opinion in Biotechnology, 2013. **24**(4): p. 672-681.
94. Laurent, S., et al., *Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Advances in Colloid and Interface Science, 2011. **166**(1-2): p. 8-23.
95. Kumar, C.S.S.R. and F. Mohammad, *Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(9): p. 789-808.
96. Obaidat, I.M., et al., *Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia*. Nanomaterials, 2015. **5**(1): p. 63-89.

97. Mahmoudi, M., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(1-2): p. 24-46.
98. Dobson, J., *Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles*. Nature Nanotechnology, 2008. **3**(3): p. 139-143.
99. Wu, Y., et al., *A novel calcium phosphate ceramic-magnetic nanoparticle composite as a potential bone substitute*. Biomedical Materials, 2010. **5**(1).
100. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2003. **36**(13): p. R167-R181.
101. Gu, H.W., et al., *Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection*. Chemical Communications, 2006(9): p. 941-949.
102. Wikipedia. *Weiss domains in a ferromagnetic material*. 2013 2015/04/14]; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Weiss_domains_in_a_ferromagnetic_material.png.
103. Uchiyama, M.K., et al., *Ultrasmall cationic superparamagnetic iron oxide nanoparticles as non-toxic and efficient MRI contrast agent and magnetic-targeting tool*. International Journal of Nanomedicine 2015.
104. Durdureanu-Angheluta, A., et al., *Heparin-anthranoid conjugates associated with nanomagnetite particles and their cytotoxic effect on cancer cells*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(1): p. 131-42.
105. Lee, K.J., et al., *In vitro analysis of the anti-cancer activity of mitoxantrone loaded on magnetic nanoparticles*. J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(6): p. 1071-5.
106. Sivakumar, B., et al., *Bacterial exopolysaccharide based magnetic nanoparticles: a versatile nanotool for cancer cell imaging, targeted drug delivery and synergistic effect of drug and hyperthermia mediated cancer therapy*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(6): p. 885-99.
107. Reddy, L.H., et al., *Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications*. Chem Rev, 2012. **112**(11): p. 5818-78.
108. Huang, J., et al., *Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles*. Theranostics, 2012. **2**(1): p. 86-102.
109. Junior, J.E., et al., *Complicações do uso intravenoso de agentes de contraste à base de gadolínio para ressonância magnética*. Radiologia Brasileira, 2008. **41**(4): p. 263 - 267.
110. Uchiyama, M.K., et al., *In vivo and in vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system*. Toxicol Sci, 2014. **142**(2): p. 497-507.
111. Wu, X., et al., *Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells*. Int J Nanomedicine, 2010. **5**: p. 385-99.
112. Marcu, A., et al., *Magnetic iron oxide nanoparticles as drug delivery system in breast cancer*. Applied Surface Science, 2013. **281**(0): p. 60-65.
113. Sun, Z., et al., *Characterization of cellular uptake and toxicity of aminosilane-coated iron oxide nanoparticles with different charges in central nervous system-relevant cell culture models*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 961-70.
114. Barrefelt, A., et al., *Biodistribution, kinetics, and biological fate of SPION microbubbles in the rat*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 3241-54.
115. Caruntu, D., et al., *Synthesis of variable-sized nanocrystals of Fe₃O₄ with high surface reactivity*. Chemistry of Materials, 2004. **16**(25): p. 5527-5534.
116. Fortes, Z.B., et al., *Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus*. Diabetes, 1991. **40**(10): p. 1267-1273.

117. Jain, T.K., et al., *Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats*. Mol Pharm, 2008. **5**(2): p. 316-27.
118. Friak, M., et al., *Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite*. New Journal of Physics, 2007. **9**.
119. Kittel, C., *Introduction to solid state physics*. 8th ed. 2005, Hoboken, NJ: Wiley. xix, 680 p.
120. Thomsen, L.B., et al., *Uptake and transport of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through human brain capillary endothelial cells*. ACS Chem Neurosci, 2013. **4**(10): p. 1352-1360.
121. Ali, L.M., et al., *Hemostasis disorders caused by polymer coated iron oxide nanoparticles*. J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(7): p. 1272-1285.
122. Toma, S.H., et al., *Pushing the surface-enhanced Raman scattering analyses sensitivity by magnetic concentration: A simple non core-shell approach*. Analytica Chimica Acta, 2015. **855**(0): p. 70-75.

APÊNDICE 1*

Teoria do Espalhamento Dinâmico de Luz

Espalhamento Dinâmico de Luz, em inglês *Dynamic Light Scattering* (DLS), e também conhecida como *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS), é uma técnica utilizada para medir a distribuição de tamanho de partículas dispersas em meio líquido. Seu limite de detecção varia de 1 a 10.000 nm (10 µm) na maioria dos equipamentos. Basicamente mede a velocidade de mudança da posição das partículas em função do tempo causado pelo movimento Browniano, que está diretamente correlacionado com o tamanho das partículas. A posição é determinada através da incidência de um feixe de laser sobre as partículas e analisando-se as flutuações de intensidade da luz espalhada pelas mesmas.

Flutuações de intensidade da luz espalhada

Se uma pequena partícula é iluminada por uma fonte de luz como um laser, a partícula irá espalhá-la em todas as direções. Se um anteparo for posicionado próximo à partícula, este será iluminado pela luz espalhada. Agora, se o anteparo for colocado junto a um grande número de partículas estacionárias, sobre o anteparo deverá aparecer um padrão de áreas claras e escuras como mostrado na **Figura A1-1**.

* Tradução e adaptação do manual do equipamento Zetasizer da Malvern, Capítulo 13

Figura A1-1: Ilustração da projeção do padrão de áreas claras e escuras sobre um anteparo causada pelo espalhamento de luz de inúmeras partículas.

As áreas claras correspondem à luz espalhada pelas partículas e que chegam ao anteparo em fase e sofrem interferência construtiva, aumentando a intensidade da luz e, assim, formando pontos claros. Por outro lado, as áreas escuras são devidas a fótons que chegam fora de fase sofrendo interferência destrutiva, diminuindo a intensidade da luz.

Até aqui, foi considerado uma condição estacionária, o que não corresponde à realidade, pois partículas em um meio líquido estão em constante movimento aleatório quando na ausência de qualquer força externa. Esse movimento é conhecido como Movimento Browniano, que acontece devido à colisão aleatória das moléculas do solvente que circundam as partículas. Uma característica intuitiva desse movimento é que partículas pequenas (menor massa) movem-se mais rapidamente do que partículas maiores (maior massa) devido a menor inércia. E a equação de Stokes-Einstein, baseada no movimento Browniano, correlaciona o tamanho das partículas com suas velocidades de deslocamento.

The scattered light falling on the detector.

Figura A1-2: Representação do princípio de funcionamento do DLS. Um feixe de laser é incidido sobre uma suspensão coloidal, onde uma pequena fração será espalhada devido à presença de partículas e analisada por um detector ao longo do tempo.

Como as partículas estão constantemente em movimento, o padrão de manchas no anteparo deverá mudar continuamente em função do tempo. Enquanto as partículas vão se movendo, os fótons espalhados alcançam o detector alterando o padrão de claro e escuro em função das interações em fase e fora de fase fazendo com que as áreas de claro e escuro se movimentem como se estivessem flutuando. Assim, os equipamentos basicamente medem a taxa de flutuação da intensidade e utiliza esse parâmetro para calcular o tamanho das partículas como mostrado na **Figura A1-2**.

Interpretando os dados de flutuação de luz espalhada

No equipamento existe um componente chamado correlacionador digital, que basicamente mede o grau de similaridade do padrão de espalhamento de sinais num determinado período em relação ao de um tempo zero ($t=0$, referência). Se o tempo ($t+\delta t$) for curto, os padrões serão bem similares entre si e terão elevado grau de correlação. Se a comparação for com o padrão adquirido após um tempo um pouco maior ($t+2\delta t$), ainda haverá um bom grau de correlação entre os dois sinais, mas não como no tempo $t+\delta t$. Assim,

claramente o grau de correlação diminuirá em função do tempo. Agora, considerando o sinal num tempo 't' muito maior, provavelmente não será mais observado nenhuma correlação entre os mesmos, pois as partículas terão se movimentado aleatoriamente em todas as direções devido ao seu movimento Browniano. Nesta técnica, como as partículas são muito pequenas, o tempo necessário para a perda completa da correlação é muito pequeno, na escala de um até décimos de milissegundos. Por isso o ' δt ' é da ordem de nano a microssegundos.

A função de correlação decai de um valor numericamente igual a 1 em $t=0$ (máxima correlação) para zero num tempo suficientemente longo, onde não se observa nenhuma correlação como mostrado na **Figura A1-3**. Ou seja, a função de correlação vai decaindo em $(t+3\delta t)$, $(t+4\delta t)$, $(t+5\delta t)$, etc, até eventualmente atingir o zero e este tempo está relacionada com o tamanho da partícula.

Figura A1-3: Gráfico da função de correlação em função do tempo.

Usando a função de correlação para calcular o tamanho de partícula

Se uma partícula grande estiver sendo monitorada, como esta move-se mais vagarosamente, a intensidade do padrão de manchas também irá flutuar no mesmo ritmo. O mesmo raciocínio deve ser aplicado para partículas menores, sendo estas mais rápidas.

O gráfico abaixo mostrado na **Figura A1-4** apresenta a função de correlação de partículas grandes e pequenas, onde a taxa de decréscimo (inclinação da curva) é maior para partículas pequenas do que para as grandes.

Figura A1-4: Comparação das funções de correlação em função do tempo para partículas grandes e pequenas.

A partir desta função de correlação, o software do equipamento utiliza algoritmos para relacionar essa taxa de decréscimo com faixas de tamanhos de partículas para gerar uma distribuição de tamanho. Um histograma típico de distribuição de tamanhos é mostrado na **Figura A1-5**. O eixo das abscissas corresponde à distribuição dessas classes de tamanhos, em nanômetros, enquanto que o das ordenadas se refere à intensidade de sinal da luz espalhada (distribuição por intensidade).

Apesar da distribuição de tamanho gerada pelo equipamento ser uma distribuição por intensidade, esta pode ser convertida em distribuição por volume através da Teoria de Mie, e desta para distribuição por número de partículas. Esta última é mais limitada, pois pequenos erros na função de correlação gera grandes erros neste tipo de distribuição.

Figura A1-5: Histograma típico de distribuição de tamanhos por intensidade.

Distribuição por intensidade, volume e número

Para entender a diferença entre esses tipos de distribuições, será considerado dois tamanhos médios de partículas distintos (5 e 50 nm) em quantidades de partículas iguais.

O primeiro gráfico da **Figura A1-6** mostra uma distribuição por número, onde aparecem dois picos com tamanhos iguais (1:1) pelo fato de existirem o mesmo número de partículas para ambos os tamanhos de partícula.

Já no segundo gráfico da **Figura A1-6** a distribuição é por volume, onde a área do pico de partículas de 50 nm é 1000 vezes maior do que aquela de 5 nm (1:1000). Isso porque o volume de uma partícula de 50 nm de diâmetro é 1000 vezes maior do que uma de 5 nm (o volume de uma esfera é igual a $\frac{4}{3}\pi(r)^3$).

Finalmente o terceiro gráfico da **Figura A1-6** mostra uma distribuição por intensidade, onde a área do segundo pico agora é 1.000.000 (um milhão) de vezes maior do que a do primeiro. Isso porque partículas maiores espalham luz até um milhão de vezes mais do que as pequenas (aproximação de Rayleigh).

Figura A1-6: Representação da distribuição de tamanhos por número, volume e intensidade de uma amostra contendo partículas de 5 e 50 nm de diâmetro em quantidades iguais.

APÊNDICE 2[†]

Teoria do Potencial Zeta

O princípio de medida do potencial- ζ se baseia na mobilidade eletroforética aplicada à equação de Henry. Essa mobilidade é medida pelo equipamento através da realização de um experimento eletroforético na amostra através do arranjo instrumental, medindo a velocidade das partículas a partir de um velocímetro Doppler a laser, no inglês *Laser Doppler Velocymeter (LDV)*.

Potencial Zeta e a camada dupla elétrica

A presença de grupos eletricamente carregados na superfície de uma partícula implica na presença de íons de carga oposta próximos a esta superfície para garantir a neutralidade elétrica. Tais contra-íons são provenientes do meio em que a partícula está dispersa, assim gerando uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula.

A camada de solvente ao redor da partícula pode ser dividida em duas partes: 1) **região interna**, chamada camada de *Stern*, mais próxima à superfície da partícula, onde os íons estão fortemente ligados eletrostaticamente às partículas e 2) **região externa** ou de difusão, mais distante da superfície da partícula, onde estão mais fracamente ligados. Na camada de difusão há uma região de fronteira onde ainda existe uma interação significativa de atração entre a partícula e os contra-íons, de modo que estes se encontram no raio de interação e se movem juntos no meio no qual estão dispersos. Esta fronteira é denominada plano de escudo hidrodinâmico ou *slipping plane* como mostrado na **Figura A2-1**. O potencial elétrico medido nesta região de fronteira é denominado **potencial- ζ** .

[†] Tradução e adaptação do manual do equipamento Zetasizer da Malvern, Capítulo 15

Figura A2-1: Representação da dupla camada elétrica e da região do “slipping plane” ao redor de uma partícula com carga superficial negativa.

A magnitude do potencial- ζ é importante, pois pode ser utilizado como um parâmetro que mede a estabilidade coloidal de uma dispersão de nanopartículas em meio aquoso. Este pode ser um sólido disperso em um líquido ou um líquido disperso em outro, por exemplo, uma emulsão.

Se todas as partículas em suspensão apresentam um alto potencial- ζ positivo ou negativo, estas irão se repelir mutuamente (repulsão eletrostática) inibindo os processos de agregação/floculação. Mas se as partículas apresentarem baixo potencial- ζ , as forças de repulsão não serão suficientes para prevenir a agregação/floculação das mesmas. Existe um consenso na literatura de que o limiar entre a estabilidade/instabilidade coloidal em meio aquoso se dá em +30 mV ou -30 mV. Ou seja, dispersões aquosas de partículas com potencial- ζ mais positivo do que +30 mV ou mais negativo do que -30 mV são consideradas estáveis.

O fator mais importante que afeta o potencial- ζ é o **pH**, tanto que um valor de potencial- ζ sem controle de pH é um valor sem significado. Considerando uma partícula com

potencial- ζ negativo, se uma base for adicionada ao meio de dispersão, esta adquirirá mais carga negativa devido à desprotonação dos grupos químicos presentes. Mas se for adicionado ácido, haverá uma condição na qual toda a carga negativa em sua superfície será neutralizada, e em pH's menores que isso o potencial- ζ das partículas se tornará positivo como mostrado na **Figura A2-2**. No **ponto isoelétrico**, onde o potencial- ζ é zero, a estabilidade coloidal será mínima.

Figura A2-2: Gráfico da variação do potencial- ζ de uma partícula presente em uma amostra em função do pH do meio.

APÊNDICE 3

Contagem das células em Câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer (Figura A3-1 e 2) coberta por uma lamínula, comporta um volume total de $0,1\text{mm}^3$. Como 1 cm^3 é equivalente a $1,0\text{ mL}$, a quantidade de células por mL e o número total de células pode ser determinado. A profundidade central da câmara é de 1 mm . No desenho das Figuras A3-1 e 2, percebe-se que a região está, primeiramente, dividida em 9 grandes áreas de 1 mm^2 cada. As 4 áreas grandes angulares (L) são subdivididas em 16 áreas com $0,25\text{ mm}$ de cada lado. Elas servem para a contagem de leucócitos. A grande área central é subdividida em 25 grupos de quadrados de $0,2\text{ mm}$ de cada lado. Cada grupo consiste de 16 mini-áreas com $0,05\text{ mm}$ de lado, tendo cada área $0,0025\text{ mm}^2$. Os 5 grupos marcados (E) são usados para a contagem de eritrócitos. Pode-se observar que todas as áreas têm uma borda tripla em cada lado. A linha central é o limite e determina quando uma célula deve ser incluída na contagem ou não.

Figura A3-1: Representação da ampliação da região de interesse de uma câmara de Neubauer utilizada para contagem de células.

Figura A3-2: Detalhamento da câmara de Neubauer utilizada para a contagem de células

SÚMULA CURRICULAR

MAYARA KLIMUK UCHIYAMA

Endereço:

Prof. Lineu Prestes Av., 748 – Bl 2T – Sl 223

Cidade Universitária, CEP. 05508-900

Universidade São Paulo - USP

São Paulo – SP – Brasil

(+5511) 3091 - 3819 (laboratório)

mayklimuk@gmail.com

1) Formação

Período	Atividade	Descrição e Instituição
Fev/ 2010 – Jun/2015	Doutorado	Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil <i>Título: Nanobiomaterias e suas aplicações em diagnóstico e tratamento de doenças</i> Orientador: Prof. Dr. Koiti Araki Co-orientador: Prof. Dr. Walter Colli Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Ago/2011 – Jun/2015	Graduação	Bacharelado em Química Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil
Ago/2006 – Dez/2009	Graduação	Bacharelado em Ciências Moleculares Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil <i>Título: Síntese e Aplicações de Nanobiomateriais: Nanopartículas Metálicas associadas a Proteínas</i> Orientador: Koiti Araki/ Bolsa: CNPq

2) Histórico profissional e prêmios

HISTÓRICO PROFISSIONAL

Fevereiro/2010 – Março/2015

Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Prof. Dr. Koiti Araki e Laboratório de Bioquímica do Parasita do Prof. Dr. Walter Colli, Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Doutorado Direto sob orientação do Professor Koiti Araki e co-orientação do Professor Walter Colli

Suporte Financeiro: Fapesp

Projeto: "Nanobiomateriais e suas aplicações em diagnóstico de doenças"

- Desenvolvimento de nanopartículas de ouro conjugadas de diferentes formas a anticorpos: síntese, caracterização, estudo de fatores que afetam a estabilização e compreensão da interação proteína-nanopartículas;
- Estudo de toxicidade *in vitro* e *in vivo* no sistema vascular e das propriedades anti-inflamatórias de nanopartículas de ouro conjugadas a anticorpos;
- Exploração de nanopartículas catiônicas superparamagnéticas ultrapequenas de magnetita como agentes de contraste em IRM e sua acumulação magnética em locais de interesse terapêutico através de campo magnético externo fixo.

Agosto/2008 – Dezembro/2009

Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Prof. Dr. Koiti Araki e Laboratório de Bioquímica do Parasita do Prof. Dr. Walter Colli, Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Estágio de Iniciação Científica sob orientação do Professor Koiti Araki e co-orientação do Professor Walter Colli

Suporte Financeiro: CNPq

Projeto: "Síntese e aplicações de nanocompósitos: nanopartículas metálicas associadas a proteínas"

- Desenvolvimento de nanopartículas de ouro bioconjugadas a anticorpos: síntese, caracterização, estudo de fatores que afetam a estabilização e compreensão da interação proteína-nanopartículas;

- Modificação do método ELISA usando esses bioconjugados para comprovar que o reconhecimento do antígeno permanece seletiva e com alta afinidade pelo anticorpo ancorado na superfície da nanopartícula.

Julho/2007 – Julho/2008

Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Prof. Dr. Koiti Araki, Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Estágio de Iniciação Científica sob orientação do Professor Koiti Araki

Suporte Financeiro: CNPq

Projeto: "Pigmentos à base de nanopartículas de ouro para aplicações em cerâmicas odontológicas"

- Desenvolvimento de novos materiais híbridos contendo nanopartículas de ouro (AuNP) incorporadas em matrizes de sílica, vidro ou cerâmica, que podem ser utilizados como cerâmicas dentárias especiais com pigmento vermelho, termicamente estável, não tóxico e, formada no processo de fusão das películas / sinterização.

PRÊMIOS

Mai/2010 – 1º lugar – Prêmio de melhor pôster apresentado, intitulado “Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro conjugadas com anticorpos, visando aplicação em diagnóstico de doenças” na 33ª Reunião Anual da SBQ - Seção de Química de Superfícies e Colóides.

3) Lista de resultados de pesquisa mais relevantes

- **ARTIGOS**

UCHIYAMA, M. K.; DEDA, D. K.; DE PAULA RODRIGUES, S. F.; DREWES, C. C.; BOLONHEIS, S. M.; KIYOHARA, P. K.; DE TOLEDO, S. P.; COLLI, W.; ARAKI, K.; FARSKY, S. H. P. *In Vivo and In Vitro Toxicity and Anti-Inflammatory Properties of Gold Nanoparticle Bioconjugates to the Vascular System*. Toxicological Sciences (fator de impacto: 4,478), **2014**, 142 (2): 497-507

UCHIYAMA, M. K.; TOMA, S. H.; RODRIGUES, S. F.; SHIMADA, A. L.; AZEVEDO, R.; RODRIGUEZ, H. J. C.; DE OLIVEIRA, P. V.; LUZ, M. S.; TOMA, H. E.; ARAKI, K.; RABBANI, S. R. *Ultrasmall Cationic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Non-toxic and Efficient*

MRI Contrast Agent and Magnetic-Targeting Tool. Artigo científico submetido ao *Journal of Biomedical Nanotechnology* (fator de impacto: 7,578).

- **PATENTES**

UCHIYAMA, M. K.; ARAKI, K.; CONDOMITTI, U.; TOTTI, A.; TOMA, H. E. *Método de Tratamento de Água e Kit Nanomagnético de Tratamento de Água*. **2014**, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140241256, data de depósito: 29/09/2014, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

UCHIYAMA, M. K.; TOMA, S. H.; RODRIGUES, S. F.; SHIMADA, A. L.; RODRIGUEZ, H. J. C.; TOMA, H. E.; ARAKI, K.; FARSKY, S. H. P.; RABBANI, S. R. *Nanopartículas e seu Uso como Agente de Contraste em Imagem por Ressonância Magnética*. **2015**, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150130317, data de depósito: 08/06/2015, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

4) Link para página web MyResearcherID

<http://www.researcherid.com/rid/O-6211-2014>

5) Outras informações

COLABORAÇÕES

Junho/2014 - presente

Laboratório da Professora Laura Fabris, Material Science and Engineering Department, Rutgers - The State University of New Jersey, EUA

Experiência Internacional por quatro meses

Suporte Financeiro: FAPESP

- Desenvolvimento de um novo nanomaterial do tipo *core-satellite* baseado em nanopartículas esféricas de ouro totalmente recobertas por pequenas nanopartículas magnéticas catiônicas (tratamento de hipertermia) modificadas com ácido mercapto-benzóico (reportador Raman para diagnóstico), PEG (biocompatibilidade), rodamina (fluorescência) e ciclo-RGD (peptídeo alvo) como uma ferramenta para teranóstica (diagnóstico e tratamento) do câncer.

Agosto/2010 - presente

Laboratório de Toxicologia Experimental da Profª Drª Sandra H. P. Farsky, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Suporte Financeiro: FAPESP

- Estudo da internalização das nanocápsulas em células cancerosas utilizando o microscópio CytoViva®;
- Estudos *in vitro* de efeitos tóxicos agudos de nanopartículas de ouro bioconjugadas no sistema vascular e *in vivo* em ratos Wistar machos por Intavital Microscopia;
- Estudos *in vivo* de biodistribuição e eliminação de nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs) em ratos Wistar machos e avaliar os efeitos tóxicos agudos causados utilizando Microscopia Intavital, leucograma, dosagem de enzimas hepáticas e renais;
- Estudo *in vivo* na avaliação do efeito terapêutico das nanopartículas de ouro em modelo murino de acidente vascular cerebral isquêmico focal, explorando as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do ouro.

Janeiro/2012 - presente

Laboratório de Ressonância Magnética do Professor Said R. Rabbani, Instituto de Física (IF), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

- Exploração de nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs) como agente de contraste para Imagem por Ressonância Magnética (MRI) visando detecção de doenças;
- Concentração magnética de SPIONs através de um campo magnético externo no local de interesse terapêutico.

Janeiro/2012 - Junho/2013

Laboratório de Imunopatologia das Professoras Eliana F. de L. Mauro e Irene Fernandes, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

- Otimização da digestão de anticorpos policlonais de coelho com enzimas papaína e pepsina, visando o desenvolvimento de nanopartículas de ouro conjugadas às porções Fab e F (ab')₂ do anticorpo.

MONITORIAS

- 2º semestre de 2009
Monitora da disciplina de Físico-Química (CCM0214 - Química III) oferecida ao Curso de Ciências Moleculares, sob supervisão do Professor Paulo Teng An Sumodjo. Bolsista do Programa de Graduação. IQ-USP.
- 1º semestre de 2010
Monitora da disciplina Fundamentos de Espectroscopia e Métodos Espectroscópicos (QFL-2144) oferecida ao 3º ano do Curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química (IQ), sob

supervisão do Professor Dr. Koiti Araki. Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). IQ-USP.

- 2º semestre de 2010

Monitora da disciplina Química dos Elementos (QFL-2143) oferecida ao 2º ano do Curso de Bacharelado em Química do Instituto de Química (IQ), sob supervisão da Professora Dra. Denise de Oliveira Silva. Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). IQ-USP.

- 1º semestre de 2012

Monitora da disciplina Química Geral e Inorgânica Básica (QFL-1100) oferecida ao Curso de Bacharelado do Instituto de Oceanografia (IO), sob supervisão da Professora Dra. Denise de Oliveira Silva. Bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). IQ-USP.