

Universidade de São Paulo
Instituto de Física

Efeito citotóxico de nanopartículas de prata em células
envolvidas na regeneração/reparação tecidual: um
estudo usando metabolômica baseado em ^1H -RMN

Cristofher Victor Vivas Palomares



Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física da
Universidade de São Paulo, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior (IFUSP)

Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini (IFUPS)

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes (FCF USP)

Profa. Dra. Martha Gonzáles Pérez (IPT)

Prof. Dr. Tiago Ribeiro de Oliveira (UFABC)

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Vivas Palomares, Cristofher Victor

Efeito citotóxico de nanopartículas de prata em células envolvidas na regeneração/reparação tecidual: um estudo usando metabolômica baseado em ^1H -RMN. São Paulo, 2022.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Geral.

Orientador: Prof.Dr. Antonio Carlos Bloise Junior

Área de Concentração: Física.

Unitermos: 1. Biofísica; 2. FN1; 3. HUV-EC-C; 4. RAW 264.7; 5. AgNPs; 6. Metabolômica.

USP/IF/SBI-73/2022

University of São Paulo
Physics Institute

Cytotoxic effects of silver nanoparticles on cells
involved in tissue regeneration/repair: a study using
 ^1H -NMR-based metabolomics

Cristofher Victor Vivas Palomares

Supervisor: Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior

Thesis submitted to the Physics Institute of the University of São Paulo in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science.

Examining Committee:

Prof. Dr. Antonio Carlos Bloise Junior (IFUSP)

Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini (IFUPS)

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes (FCF USP)

Profa. Dra. Martha Gonzáles Pérez (IPT)

Prof. Dr. Tiago Ribeiro de Oliveira (UFABC)

São Paulo

2022

“Dedicado a meu avó
Eliseo Vivas
por seus conselhos, dedicação e
amor”.

AGRADECIMENTO

Aos meus avos Eliseo Vivas e Eudosia Palomares, pelos sábios conselhos e ensinamentos que sempre me deram desde criança para ser uma pessoa com valores.

Aos meus pais Mesias Vivas e Julia Palomares, e irmãos, Darwin, Erika, Belen e Nelson, pelo incentivo, apoio incondicional e compreensão nestes anos de doutorado que souberam entender a minha ausência.

À Antonio Bloise, pela orientação neste trabalho e por tudo que me ensinou e vem ensinando durante nossos anos de convivência.

Aos professores Koeti Araki (IQUSP), Marco Stephano (FCFSP) e Adriano Alencar (IFUSP) pelas discussões sempre esclarecedoras.

Aos colegas do Grupo Ligia, Jennifer e Natalia.

A Sofia por estar em estos momentos comigo.

Aos meus familiares, pelo incentivo e conversas.

Aos amigos Luis, Erick, Rodrigo e Giussepe, pela amizade desta aventura chamada pós-graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro para aquisição de insumos básicos para realização das experiências de ressonância magnética nuclear.

Muito Obrigado a Todos

“Admira a quien lo intenta, aunque fracase”

Seneca

RESUMO

O amplo e promissor potencial terapêutico das nanopartículas de prata (AgNPs) faz com que o estudo de seus efeitos biológicos seja um tema relevante e atual para o tratamento de feridas cutâneas. Neste trabalho caracterizamos AgNPs com diâmetro de 40 nm no DMEM suplementado com soro fetal bovino e estudamos seus efeitos citotóxicos e as mudanças metabólicas em células que participam na regeneração tecidual: FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7. Foram planejados tratamentos para as células do tipo dose e tempo dependentes. Os resultados da caracterização revelam uma forte interação entre as AgNPs e biomoléculas do meio, levando à formação de uma nova entidade chamada "bio-AgNPs" que apresenta variações de tamanho em função da concentração e do tempo, mas não no núcleo duro das AgNPs. Abordando os aspectos de citotoxicidade das bio-AgNPs, foram observadas importantes alterações nas três linhas celulares, com um decréscimo sistemático na população celular viável acompanhado de mudanças morfológicas e de áreas celulares quando a concentração das bio-AgNPs aumenta. A análise dos níveis dos metabolomas, endo e exo, revelam que as vias metabólicas fundamentais das três linhagens celulares foram ativadas como resposta aos tratamentos com as bio-AgNPs. Para as células FN1 e HUV-EC-C, as bio-AgNPs aceleram a via da glicólise e induzem as células ao desperdício de energia através da oxidação do piruvato/AcOH fazendo com que elas degradem suas reservas de aminoácidos para produzir energia e tentar ativar o ciclo TCA. De forma simultânea, a via cetogênica é acelerada. Um efeito contrário é apresentado pelas células RAW 264.7 tal que a via da glicólise é inalterada, conduzindo para um metabolismo mais aeróbico através da aceleração do TCA e da síntese de aminoácidos. No entanto, o metabolismo da colina é desacelerado, reduzindo seus subprodutos betaine e glicina, assim como comprometendo a síntese da molécula energética creatina. Por outro lado, para FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 os valores reduzidos da fosfocolina e Sn-Glycerol-3-PC, assim como do piroglutamato, indicam uma desaceleração do metabolismo fosfolipídico e uma aceleração da biossíntese da glutathione para re-equilibrar os efeitos do estresse oxidativo induzido pelas bio-AgNPs. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a reportar sobre mudanças induzidas por bio-AgNPs nos níveis das moléculas de UDP-GlcNAc (FN1 e HUV-EC-C) e TMAO (RAW 264.7) as quais desempenham papéis essenciais na modificação das proteínas núcleo-citoplasmáticas e em doenças inflamatórias.

Palavras-chave: FN1, HUV-EC-C, RAW 264.7, AgNPs, Toxicidade e Metabolismo.

ABSTRACT

The broad and promising therapeutic potential of silver nanoparticles (AgNPs) develops the study of their biological effects, a relevant and updated theme for the treatment of skin wounds. In this work, we characterized AgNPs with a 40 nm diameter in DMEM supplemented with bovine fetal serum and studied their cytotoxic effects and metabolic alterations in specific cells that participate in tissue regeneration like FN1, HUV-EC-C and RAW 264.7. Treatments planned through doses and incubation times were planned for cells. The results of the characterization revealed a strong interaction between the AgNPs and biomolecules of the medium, leading to the formation of a new entity called "bio-AgNPs" that presents variations in size as a function of concentration and time but not of the hard core of AgNPs. Addressing the cytotoxicity aspects of the bio-AgNPs, important changes were observed in the three cell lines, with systematic degrowth in the viable cell population, accompanied by morphological and cellular area alterations, when the concentration of the bio-AgNPs increased. The analysis of the metabolome levels (endo-metabolome e exo-metabolome), reveals the fundamental metabolic pathways of the three cell lines were activated in response to bio-AgNPS treatments. For FN1 and HUV-EC-C cells, the bio-AgNPs up-regulate the glycolysis pathway and induce the cells to consume energy through the oxidation of pyruvate/AcOH, causing them to degrade their amino acid reserves to produce energy and try to activate the TCA cycle. At the same instant, simultaneously, the ketogenic pathway is up-regulated. A contrary effect is indicated for RAW cell 264.7, where the glycolysis pathway is unchanged, driving an aerobic metabolism through up-regulation of the TCA cycle and amino acid synthesis. However, choline metabolism is down-regulated, reducing its betaine and glycine sub-products as well as compromising the synthesis of the creatine energy molecule. On the other hand, for FN1, HUV-EC-C and RAW 264.7, the reduced values of phosphocholine and Sn-Glycerol-3-PC, as well as pyroglutamate, indicate down-regulation in phospholipid metabolism and up-regulation of glutathione biosynthesis to counterbalance the effects of oxidative stress induced by bio-AgNPs. As far as we know, this is the first study to report on bio-AgNP-induced changes in the levels of UDP-GlcNAc (FN1 and HUV-EC-C) and TMAO (RAW 264.7), which play essential roles in cytoplasmic nucleus protein modification and inflammatory diseases.

Keywords: FN1, HUV-EC-C, RAW 264.7, AgNPs, cytotoxic and Metabolism.

Manuscritos resultantes deste trabalho realizado dentro desta tese

1. Submissão artigo (1-11-2022): Cristopher Victor Vivas Palomares, Jennifer Adriane dos Santos, Sergio Hiroshi Toma, Jonnatan Julival dos Santos, Marco Antonio Stephano, Cristiano Luis Pinto de Oliveira, Koiti Araki, Adriano Mesquita Alencar, Antonio Carlos Bloise Junio. Biochemical response of human endothelial and fibroblast cells to silver nanoparticles. *Scientific Reports*.
2. Submissão artigo (21-11-2022): Cristopher Victor Vivas Palomares, Sergio Hiroshi Toma, Jonnatan Julival dos Santos, Marco Antonio Stephano, Koiti Araki, Adriano Mesquita Alencar, Antonio Carlos Bloise Junio. Metabolic profiling of macrophages exposed to silver nanoparticles at dose and time dependencies. *Particles and particles system characterization*.
Manuscrito em preparação
3. Cristopher Victor Vivas Palomares, Sergio Hiroshi Toma, Cristiano Luis Pinto de Oliveira, Marco Antonio Stephano, Koiti Araki, Adriano Mesquita Alencar, Antonio Carlos Bloise Junio. Silver nanoparticle interaction with cell culture medium (SFB+DMEM) at dose and time dependencies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Linha do tempo da cicatrização de feridas ilustrando os três tipos de fases, chegada dos diferentes tipos de células e ocorrência dos principais eventos.</i>	28
Figura 2	<i>Nanopartículas de prata com diferentes formas: (A) pirâmide, (B) decaedro, (C) esfera pequena, (D) bi-pirâmide, (E) cubo, (F) esfera mediana, (G) vara, (H) octaedro truncado e (I) esfera grande (Dykman et al., 2011, Koczkur et al., 2015 e Bulavinets et al., 2018). Figura adaptada e modificada de “shape of silver nanoparticle”, Dreamstime.com.</i>	31
Figura 3	<i>Visão geral da plataforma analítica Metabolômica</i>	39
Figura 4	<i>Na esquerda, os níveis de energia do sistema de dois spins. As setas mostram as transições permitidas: linhas solidas por uma transição na qual o spin 1 se movimenta e as pontilhadas na qual o spin 2 se movimenta. Na direita, podemos ver os correspondentes espectros, assumindo que a frequência de Lamor do spin 2 é maior em magnitude que do spin 1 e que o acoplamento J_{12} é positivo. (Figura extraída e modificada de James Keeler, 2002).</i>	48
Figura 5	<i>Para $t > 0$, o efeito do pulso de $\phi = 90^\circ$ é suficiente para que o vetor de magnetização, M_0 no equilíbrio seja convertido em magnetização transversal, fazendo um ângulo de, $\alpha = 90^\circ$, em relação ao eixo Z. Esquerda: representação no referencial de laboratório (RL). Direita: representação no sistema rotante (RR). (Figura extraída e modificada de James Keeler, 2002)</i>	51
Figura 6	<i>(a) Sinal de decaimento exponencial (FID). (b): Espectros de RMN, encontrados através da transformada de Fourier (Figura extraída e modificada de Bonin, 2011).</i>	54

Figura 7	<i>Figura ilustrando a integração das principais vias metabólicas em células animais. Piruvato da glicólise, é convertido em lactato e liberado fora da célula, ou usado como substrato energético para o ciclo TCA. O ciclo TCA também pode ser ativado por aminoácidos que originam acetyl-CoA, piruvato ou ciclos intermediários, ou por acetyl-CoA resultante da oxidação do ácido graxo. O Citrato gerado no ciclo TCA é usado para síntese de ácidos graxos. As caixas vermelhas, são vias que dependem do oxigênio; no entanto, caixas azuis, são vias independentes de oxigênio. Figura extraída e modificada (Carrola et al., 2020)</i>	57
Figura 8	<i>Representação esquemática de vias metabólicas. Figura da esquerda a via glicolítica (azul) e a fermentação de ácido láctico (púrpura). Os números descrevem os processos de etapas. Figura direita reação do ciclo TCA.</i>	59
Figura 9	<i>Esquema da câmara Neubauer.</i>	61
Figura 10	<i>Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela) a formazan (sal de coloração púrpura). Figura extraída de (Washington, 2018.).....</i>	62
Figura 11	<i>esquema ilustrativo da técnica de DLS.</i>	64
Figura 12	<i>Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada (adaptado de Jafelicci e Laudemir , 1999).</i>	66
Figura 13	<i>Distorção do campo elétrico aplicado sobre uma partícula esférica de raio a. As linhas tracejadas representam a espessura da camada dupla, $1/k$. (Hiemenz, 1986).....</i>	67
Figura 14	<i>Níveis de energia de uma molécula diatômica, A-B, simples. Figura baseada no texto Takara, 2006.</i>	68
Figura 15	<i>Ilustração da atenuação da luz incidente no recipiente de caminho óptico d.</i>	70
Figura 16	<i>Esquema ilustrativo da medida de SAXS</i>	72
Figura 17	<i>Estratégia planejada para os estudos da caracterização das AgNPs em meio de cultura.</i>	78
Figura 18	<i>Tratamento com as AgNPs em função das concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 185 μM) e dos intervalos de tempo de cultivo (24h, 48h, 72h e 96h).</i>	80
Figura 19	<i>Tratamento com as AgNPs em função das concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 185 μM) e dos intervalos de tempo de cultivo (24 h e 48 h).</i>	82

Figura 20	<i>Esquemas de coleta das células e dos respectivos meios de cultura, após o tratamento com AgNPs. Cada esquema deve ser considerado triplicado uma vez que foram utilizadas 3 (três) linhagens celulares no trabalho: FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 por experiência de RMN.</i>	86
Figura 21	<i>Caracterização morfo-elétrica para o estoque de nanopartículas (AgNPs-Citrate=250.3µM diluída em água ultra pura), após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de SAXS (A), DLS (B), absorção UV-vis (C) e potencial de superfície zeta (D)</i>	93
Figura 22	<i>Caracterização morfo-elétrica para o soro fetal bovino (SFB) diluído em água ultra pura na proporção 1/10, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de DLS (A), potencial de superfície zeta (B) e absorção UV-vis (C).</i>	95
Figura 23	<i>Caracterização morfo-elétrica para o meio de cultura celular (DMEM), após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de DLS (A) e absorção UV-vis (B).</i>	96
Figura 24	<i>Caracterização morfo-elétrica para o soro fetal bovino (SFB) diluído em meio de cultura celular (DMEM) na proporção de 1/10, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de DLS (A), SAXS (B), potencial de superfície zeta (C) e absorção UV-vis (D).</i>	97
Figura 25	<i>Resultados de absorção UV-vis (A) e SAXS (B) para AgNPs-Citrate diluído em meio de cultura celular (10% SFB em DMEM) para a obtenção das concentrações molar 25, 50, 75 e 100 µM de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C. As curvas para o estoque de AgNps e DMEM suplementado com SFB também são mostrados nos mesmos gráficos para fins de comparação.</i>	99
Figura 26	<i>Resultados de DLS (A), potencial zeta (B), e imagens de turbidez (C) para AgNPs-Citrato diluído em meio de cultura celular (10% SFB em DMEM) para a obtenção da concentração molar de 25, 50, 75 e 100 µM de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C. Os valores para nanopartículas de estoque e DMEM suplementado também são mostrados nos mesmos gráficos para fins de comparação.</i>	100

- Figura 27 *Curva de crescimento celular, obtido através da contagem de Neubauer, para células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 na ausência e presença de concentrações de AgNPs com um tempo de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas. 109*
- Figura 28 (A) *Microscopias ópticas mostrando os aspectos morfológicos das linhagens celulares RAW 264.7, HUV-EC-C e FN1, após a exposição com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 horas de incubação (painéis superiores esquerdo e direito); (B) Valores médios de área celular em função de concentrações molares e tempos de exposição para as linhagens RAW 264,7(diamantes azuis), HUV-EC-C (quadrados verdes) e FN1 (círculos vermelhos). As fotos microscopias foram obtidas em um microscópio invertido Leica MC170HD com ampliação $\times 10$ 112*
- Figura 29 *O número de células viáveis contadas através de ensaios (A) câmara de Neubauer e (B) MTT são mostradas em função das concentrações molares de AgNPs para as linhagens RAW 264,7(diamantes azuis), HUV-EC-C (quadrados verdes) e FN1 (círculos vermelhos) por 24 e 48 h de exposição. Os parâmetros EC50 também foram incluídos neste gráfico. 114*
- Figura 30 *Modelos ilustrativos: (A) da interação entre as AgNPs e biomoléculas do meio de cultura suplementado para a formação da nova entidade bio-AgNPs, e (B) do processo de internalização dessas nas células através da interação com as proteínas receptoras da membrana celular. 117*
- Figura 31 *Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras de meio de cultura da linhagem celular FN1 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor preta), 25 μM (ciano), 50 μM (vermelho), 75 μM (azul) e 100 μM (verde). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular em meio de cultura com nanopartículas em diferentes concentrações. 23 (vinte e três) metabólitos foram encontrados na amostra de meio de cultura e são mostrados nos espectros de embaixo em acorandça com a Tabela 12. 122*

Figura 32 *Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras de meio de cultura da linhagem celular HUV-EC-C tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor rosa), 25 μM (amarelo), 50 μM (laranja), 75 μM (verde escuro) e 100 μM (marrom). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular em meio de cultura com nanopartículas em diferentes concentrações. 23 (vinte e três) metabólitos foram encontrados na amostra de meio de cultura e são mostrados nos espectros de embaixo em acorãncia com a Tabela 12.123*

Figura 33 *Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras de meio de cultura da linhagem celular RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor vermelha), 25 μM (roxo escuro), 50 μM (celeste), 75 μM (roxo) e 100 μM (azul claro). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular em meio de cultura com nanopartículas em diferentes concentrações. 19 (dezenove) metabólitos foram encontrados na amostra de meio de cultura e são mostrados nos espectros de embaixo em acorãncia com a Tabela 12.124*

Figura 34 *Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras do extrato celular da linhagem celular FN1 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor preta), 25 μM (ciano), 50 μM (vermelho), 75 μM (azul) e 100 μM (verde). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular com nanopartículas em diferentes concentrações. 17 (dezessete) metabólitos foram encontrados na amostra do extrato celular e são mostrados nos espectros de embaixo em acorãncia com a Tabela 13.126*

Figura 35 *Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras do extrato celular da linhagem celular HUV-EC-C tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor rosa), 25 μM (amarelo), 50 μM (laranja), 75 μM (verde escuro) e 100 μM (marrom). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular com nanopartículas em diferentes concentrações. 18 (dezoito) metabólitos foram encontrados na amostra do extrato celular e são mostrados nos espectros de embaixo em acorandça com a Tabela 13.127*

Figura 36 *Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras do extrato celular da linhagem celular RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor vermelha), 25 μM (roxo escuro), 50 μM (celeste), 75 μM (roxo) e 100 μM (azul claro). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular com nanopartículas em diferentes concentrações. 12 (doze) metabólitos foram encontrados na amostra do extrato celular e são mostrados nos espectros de embaixo em acorandça com a Tabela 13. O deslocamento químico padrão do 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) é mostrado para o RAW 264.7 por comodidade dos espectros.128*

Figura 37 *Resumo dos gráficos de score plots construídos a partir das analise de dados do extrato celular e meio de cultura da linhagem FN1, após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor preta), 25 μM (ciano), 50 μM (vermelho), 75 μM (azul) e 100 μM (verde). Os quatro gráficos da esquerda e direita designam, respectivamente, os resultados após 24 horas (A-D) e 48 horas (E-H) de tratamento como as nanopartículas, apresentando colunas correspondentes para o extrato celular (A, C, E, G) e meio de cultura (B, D, F, H). Nos parêntesis são mostradas as porcentagens de covariância de dados explicados, e os valores dos parâmetros preditivos obtidos para R^2 e Q^2 . .131*

Figura 38 *Resumo dos gráficos de score plots construídos a partir das análise de dados do extrato celular e meio de cultura da linhagem HUV-EC-C, após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs: 0 μ M ou controle (linha de cor rosa), 25 μ M (amarelo), 50 μ M (laranja), 75 μ M (verde escuro) e 100 μ M (marrom). Os quatro gráficos da esquerda e direita designam, respectivamente, os resultados após 24 horas (A-D) e 48 horas (E-H) de tratamento como as nanopartículas, apresentando colunas correspondentes para o extrato celular (A, C, E, G) e meio de cultura (B, D, F, H). Nos parêntesis são mostradas as porcentagens de covariância de dados explicados, e os valores dos parâmetros preditivos obtidos para R^2 e Q^2 .* 133

Figura 39 *Resumo dos gráficos de score plots construídos a partir das análise de dados do extrato celular e meio de cultura da linhagem RAW 264.7, após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs: 0 μ M ou controle (linha de cor vermelha), 25 μ M (roxo escuro), 50 μ M (celeste), 75 μ M (roxo) e 100 μ M (azul claro). Os quatro gráficos da esquerda e direita designam, respectivamente, os resultados após 24 horas (A-D) e 48 horas (E-H) de tratamento como as nanopartículas, apresentando colunas correspondentes para o extrato celular (A, C, E, G) e meio de cultura (B, D, F, H). Nos parêntesis são mostradas as porcentagens de covariância de dados explicados, e os valores dos parâmetros preditivos obtidos para R^2 e Q^2 .* 135

Figura 40 *Mapas de calor dos principais metabólitos variados em (A) extratos celulares, (B) meio de cultura, da célula FN1 expostas a concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os mapas são coloridos de acordo com % de variação dos metabólitos em relação aos controles. Cores consecutivas que são cercadas por linhas pretas mostram níveis de concentração diferentes ($p < 0.05$).* 138

- Figura 41 Mapas de calor dos principais metabólitos para (A) extratos celulares, (B) meio de cultura, da célula HUV-EC-C expostas a concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os mapas são coloridos de acordo com % de variação dos metabólitos em relação aos controles. Cores consecutivas que são cercadas por linhas pretas mostram níveis de concentração diferentes ($p < 0.05$). 139
- Figura 42 Mapas de calor dos principais metabólitos para (A) extratos celulares, (B) meio de cultura, da célula RAW 264.7 expostas a concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os mapas são coloridos de acordo com % de variação dos metabólitos em relação aos controles. Cores consecutivas que são cercadas por linhas pretas mostram níveis de concentração diferentes ($p < 0.05$). 141
- Figura 43 Resumo das vias metabólicas identificadas que estão mudando após o tratamento com as bio-AgNPs dependentes da dose e tempo. Tendências de aumento e diminuição dos níveis metabólicos descritos nas Figuras 40 e 41 são representadas com setas para cima e para baixo para as linhagens FN1 (seta laranja) e HUV-EC-C (seta verde). Abreviação: OXI para oxidação, LDH para lactate desidrogenase, G6P para glicose-6-fosfato, 6PG para 6-fosfogluconolacton, F6P para fructose-6-fosfato, OGT e OGA enzimas para O-GlcNAc transferasa e O-GlcNAcase, CDP para Citidina 5'-difosfocolina, e proteína nuclear citoplasmática ilustrado em púrpura. . 148
- Figura 44 Resumo das vias metabólicas identificadas que estão mudando com os tratamentos da bio-AgNPs dependentes da dose e tempo para RAW 264.7. Tendências de aumento e diminuição dos níveis metabólitos descritos na Figura 42 são representadas com setas para cima (seta azul) e para baixo (seta vermelha). Abreviaturas: α -KG para α -ketoglutarato, CDP para citidina 5-difosfocolina, PEP para fosfoenolpiruvato, ALT para alanina aminotransferase, LDH para lactato desidrogenase e GSH para glutathiona. 152
- Figura 45 Resultados de absorção UV-vis (A), DLS (B), potencial zeta (B) e imagens de turbidez (C) para AgNPs-Citrate diluído em 10% SFB em água ultra pura para a obtenção das concentrações molar 25, 50, 75 e 100 μ M de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação. 184

- Figura 46 *Comparação dos valores normalizados de cada metabolito dos extratos celulares (A) e meio de cultura (B) para a célula FN1 tratada com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 h. As diferentes letras inseridas abaixo dos valores normalizados indicam as diferenças estatísticas entre eles, testados por Fisher's test (95% confiança, $p < 0.01$). 185*
- Figura 47 *Comparação dos valores normalizados de cada metabolito dos extratos celulares (A) e meio de cultura (B) para a célula HUV-EC-C tratada com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 h. As diferentes letras inseridas abaixo dos valores normalizados indicam as diferenças estatísticas entre eles, testados por Fisher's test (95% confiança, $p < 0.01$). 186*
- Figura 48 *Comparação dos valores normalizados de cada metabolito dos extratos celulares (A) e meio de cultura (B) para a célula RAW 264.7 tratada com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 h. As diferentes letras inseridas abaixo dos valores normalizados indicam as diferenças estatísticas entre eles, testados por Fisher's test (95% confiança, $p < 0.01$). 187*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Elementos do tensor de deslocamento químico (SEP) e spin- campo (RL) na representação esférica irredutível.</i>	43
Tabela 2	<i>Valores de energia do sistema composto pelo acoplamento de dois spins. ...</i>	47
Tabela 3	<i>Valores das frequências emitidas de um estado (E_{sup}) para um (E_{inf}).</i>	47
Tabela 4	<i>Resumo da estratégia de preparação de amostras para os estudos de caracterização, viabilidade celular e metabolômica. A Tabela indica as doses, tempos de incubação e o número de réplicas de cada dose de AgNPs para cada estudo.</i>	82
Tabela 5	<i>Resumo dos principais resultados obtidos de caracterização para o estoque de AgNPs-Citrate ($250.3 \mu M$), soro fetal bovino (SFB), DMEM e 10% SFB diluído em DMEM, obtidos através de absorção Uv-vis, SAXS, DLS e zeta-potencial, após 24 e 48 horas de incubação.</i>	98
Tabela 6	<i>Resumo dos principais resultados obtidos de absorção Uv-vis, SAXS, DLS e potencial de superfície zeta para AgNPs-Citrato diluído em meio de cultura celular (10% SFB em DMEM) para a obtenção da concentração molar de 25, 50, 75 e 100 μM de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação.</i>	102
Tabela 7	<i>Valores de espessura da corona rica em moléculas biológicas obtidos para 25, 50, 75 e 100 μM de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação.</i>	106
Tabela 8	<i>Valores das taxas de proliferação, ou τ (s^{-1}), para as linhagens celulares na ausência e presença de concentrações de AgNPs com um tempo de incubação de 0-48 para FN1, HUV-EC-C e, 0-72 horas para RAW 264.7.</i>	110
Tabela 9	<i>Resumo dos parâmetros morfológicos calculados para as bio-AgNPs e linhagens celulares a partir das análises de caracterização morfo-elétrica e viabilidade celular, em função da concentração após 24 horas de incubação do arranjo.</i>	115
Tabela 10	<i>Resumo dos parâmetros morfológicos calculados para as bio-AgNPs e linhagens celulares a partir das análises de caracterização morfo-elétrica e viabilidade celular, em função da concentração após 48 horas de incubação do arranjo.</i>	116

Tabela 11 <i>Estrategia de medidas de Ressonância magnética nuclear, para caraterizar alterações em vias metabólicas específicas induzidas pelas bio-AgNPs nas linhagens celulares FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7.</i>	120
Tabela 12 <i>Designação dos metabólitos identificados nos perfis de ¹H-RMN dos meios de cultura das linhagens celulares FN1, HUV-E-C e RAW 26.7 após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os metabólitos destacados em cor ciano correspondem aos nutrientes encontrados na formulação do meio acelular de cultura DMEM.</i>	125
Tabela 13 <i>Designação dos metabólitos identificados nos perfis de ¹H-RMN dos extratos celulares das linhagens celulares FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. A abreviação de nomes dos metabólitos é mostrado na versão inglesa por fins de comodidade de análise.</i>	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de prata
Bio-AgNPs	Bio-nanopartículas de prata
FN1	Células fibroblastos
HUV-EC-C	Células endoteliais
RAW 264.7	Células macrófagos
SFB	Soro fetal bovino
DMEM	Dulbecco Modified eagle medium (meio de cultura)
10% SFB+DMEM	Meio de cultura suplementado com SFB
¹ H-RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons
HTS	Cicatriz hipertrófica
IL-1-beta	Interleucina-1-beta
IL-6	Interleucina-6
TNF-alfa	Factor de necrose tumoral
CD68+	Agrupamento de diferenciação 68 de macrófago
CD206+	Agrupamento de diferenciação 206 de macrófago
CD163+	Agrupamento de diferenciação 163 de macrófago
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
AMP	Adenosina monofosfato
MTT	Tetrazolium brometo
CCN	Contagem em câmara de Neubauer
CDC	Cinética de crescimento celular
LPS	Lipopolissacarídeo
IFN-gamma	Interferon-gama
EC50	Concentração efetiva capaz de matar o 50% de células
PDI	Índice de poli dispersividade
DMSO	Dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Processo normal de cicatrização de feridas cutâneas	25
1.1.1	Fase Inflamatória	25
1.1.2	Fase de Proliferação	26
1.1.2.1	<i>Formação do tecido de granulação</i>	26
1.1.2.2	<i>Re-epitelização</i>	27
1.1.2.3	<i>Contração do tamanho do ferimento</i>	27
1.1.3	Fase de Remodelamento	27
1.2	Processo anormal de cicatrização de feridas cutâneas ...	28
1.3	Nanopartículas de Prata	30
1.3.1	Propriedade Antitumoral	31
1.3.2	Reparo de feridas	32
1.3.3	Corona de proteína	33
1.4	Objetivos	34
1.5	Sumario dos Próximos Capítulos	35
2	TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	37
2.1	Metabolômica	37
2.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (¹H-RMN)	40
2.2.1	Relação entre o spin nuclear e o momento magnético nuclear	40
2.2.2	O Hamiltoniano e as diferentes interações em RMN	40
2.2.3	O Modelo Vetorial	48
2.2.3.1	<i>Magnetização</i>	49
2.2.3.2	<i>Pulso de radiofrequência</i>	49
2.2.3.3	<i>Interação do pulso de radiofrequência com o vetor de magnetização</i>	50
2.2.3.4	<i>Sinal de RMN</i>	51
2.2.4	Transformada de Fourier e processamento de dados	53
2.3	Análise multivariada (PLS-DA)	54
2.4	Análise univariada	56

2.5	Breve visão geral das principais vias metabólicas celulares	57
2.5.1	Glicólise	57
2.5.2	O ciclo TCA	59
2.6	Câmara de Neubauer e MTT	60
2.7	Espalhamento de luz dinâmico	63
2.7.1	Movimento Browniano	63
2.7.2	Espalhamento de Luz	63
2.8	Potencial-zeta	65
2.8.1	Medição da mobilidade eletroforética	65
2.8.2	Mobilidade eletroforética relacionada ao potencial-zeta	66
2.9	Espectroscopia de absorção UV-vis	67
2.9.1	Lei de Lambert-Beer	69
2.10	Espalhamento de raios X a baixo ângulo	71
3	MATERIAIS E MÉTODOS	75
3.1	Materiais	75
3.2	Preparação das amostras	76
3.2.1	Preparação do meio de cultura	76
3.2.2	Construção do banco de células	76
3.2.3	Preparação das nanopartículas de prata	77
3.3	Protocolos de preparação de amostras segundo o tipo estudo	77
3.3.1	Caraterização de AgNPs	77
3.3.1.1	<i>Diluição da dispersão estoque de AgNPs</i>	78
3.3.1.2	<i>Incubação em diferentes tempos</i>	78
3.3.2	Ensaio de viabilidade celular	78
3.3.2.1	<i>Descongelamento das células</i>	79
3.3.2.2	<i>Plaqueamento das células</i>	79
3.3.2.3	<i>Tratamento das células com (AgNPs)</i>	80
3.3.3	Método da metabolômica através da RMN	81
3.3.3.1	<i>Descongelamento das células</i>	81
3.3.3.2	<i>Plaqueamento das células</i>	81

3.3.3.3	<i>Tratamento das células com (AgNPs)</i>	81
3.4	Métodos Experimentais	83
3.4.1	Espalhamento de luz dinâmico	83
3.4.2	Potencial – zeta	83
3.4.3	Absorção óptica	84
3.4.4	Espalhamento de raios X a baixo ângulo	84
3.4.5	Ensaio calorimétrico MTT	85
3.4.6	Câmara de Neubauer	85
3.4.7	Extração metabólica	85
3.4.8	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (¹H-RMN)	87
3.4.8.1	<i>Aquisição dos espectros de RMN</i>	88
3.4.8.2	<i>Processamento dos espectros de RMN</i>	88
3.4.8.3	<i>Identificação de metabolitos</i>	89
3.4.9	Análise multivariada	89
3.4.10	Análise univariada	90
4	RESULTADOS	92
4.1	Caracterização das Nanopartículas de prata (AgNPs) ..	92
4.1.1	Caracterização de AgNPs em citrato	93
4.1.2	Caracterização do soro fetal bovino (SFB)	94
4.1.3	Caracterização de DMEM alta-glicose	95
4.1.4	Caracterização do meio de cultura suplementado (DMEM+10% SFB)	96
4.1.5	Interação AgNPs - 10% SFB+DMEM e formação de coronas ...	98
4.2	Estudo de viabilidade celular com Bio-AgNPs	108
4.2.1	Experiências de cinética de crescimento celular (CDC)	108
4.2.2	Análise de Morfologia e área Celular	111
4.2.3	Efeito de citotoxicidade dependente dose-resposta induzida por bio-AgNPs	113
4.3	Análise metabólica de células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 expostas a Bio-AgNPs	121
4.3.1	Metabólitos extracelulares dos meios de cultura	121

4.3.2	Metabólitos polares intracelulares	126
4.3.3	Análises estatística dos endo-exo metabolitos	130
4.3.3.1	<i>Análise multivariada PLS-DA</i>	131
4.3.3.2	<i>Análise univariada</i>	136
4.3.4	Discussão das variações nas principais vias metabólicas das células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7	142
4.3.4.1	<i>Células FN1 e HUV-EC-C</i>	143
4.3.4.2	<i>Células RAW 264.7</i>	148
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	155
	REFERÊNCIAS	159
	188

CAPÍTULO 1

“Ama a tu prójimo como a ti mismo”

Cristo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Processo normal de cicatrização de feridas cutâneas

O processo normal de cicatrização de feridas envolve a integração de atividades de vários tipos de células, e pode ser categorizado em três fases: inflamação, proliferação e remodelação (Wang et al., 2018).

1.1.1 Fase Inflamatória

Os eventos iniciais do processo de reparação tecidual estão, nos primeiros momentos, voltados para o tamponamento dos vasos sanguíneos lesionados. A injúria do endotélio (ruptura, fissura ou erosão) provoca a deposição das plaquetas que provisoriamente tampona a lesão endotelial mediante a coagulação sanguínea (Gauglitz et al., 2011). Os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue e as primeiras infiltrantes que penetram a região inflamada na ferida, sendo sua função principal neste processo a formação de uma barreira contra a invasão de bactérias e desperdício de tecidos (Berman et al., 2017).

A segunda população de células inflamatórias que invade o ferimento são os macrófagos que, ao contrário do papel desempenhado pelos neutrófilos, é o elemento mais crítico na indução do processo de reparo do tecido (Hesketh et al., 2017). Dependendo do microambiente e do componente ativador (Martin e Leibovich, 2005), os macrófagos derivados de monócitos podem-se polarizar nos fenótipos M1 e M2. Após a ativação, macrófagos M1 podem secretar citocinas tais como IL-1-beta, IL-6 e TNF-alfa (van der Veer et al., 2009), para auxiliar os neutrófilos na eliminação de micro-organismos. Estes macrófagos apresentam também seus peptídeos ligados a moléculas de complexo principal histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex, MHC*) na superfície na membrana para o reconhecimento pelas células T auxiliares (Thiessen et al., 2002). Desta forma, a fagocitose dos macrófagos atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo, sendo, portanto, a célula mais eficiente na eliminação de fragmentos teciduais (Vogel et al., 2014). A participação mais relevante no reparo tecidual é através dos macrófagos M2, os quais podem produzir e exportar citocinas de factores de crescimento tais como a plaqueta

derivada (PDGF), transformação-beta (TGF-beta), insulina-1 (IGF-1) e endotelial vascular (VEGF) para estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos durante a reparação tecidual (Verreck et al., 2006). Os macrófagos M2 também podem produzir precursores de colágeno para estimular a proliferação de fibroblastos, dando início a sua fase de proliferação, através da formação da matriz extracelular (tecido de granulação) e de angiogêneses (Krzyszczuk et al., 2018). Eles também têm uma forte participação na fase remodelação (Kurose e Mangmool, 2016).

1.1.2 Fase de Proliferação

1.1.2.1 Formação do tecido de granulação

Os fibroblastos derivados principalmente dos macrófagos M2 são os principais componentes da formação do tecido de granulação. Estes, ao serem ativados, migram das margens das feridas para o seu centro. Com o aumento do número de fibroblastos para a produção de colágeno tipo I e tipo III no local de ferimento, a matriz extracelular começa a ser substituída por um conjunto mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e dá início a formação do tecido de granulação por volta do quarto dia (ver Figura 1) (Su et al., 2010). No entanto, este tecido caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais sangram com facilidade. Portanto, para a eficiência da fibroplasia é necessário em paralelo a formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessário a angiogênese (Carmeliet, 2005).

A angiogênese é essencial neste estágio porque permite a formação de novos capilares de vasos já existentes. As células protagonistas na angiogênese são as microvasculares endoteliais, as quais, do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar colagenase e outras enzimas. Essas enzimas permitem a abertura da membrana basal e a migração das células endoteliais que atravessando a parede do vaso irão em direção à região da lesão. Já, nesta região, elas passam pelo processo de diferenciação para aquisição da formação de novos tubos capilares e, após isso, unem-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (Carmeliet, 2005).

1.1.2.2 *Re-epitelização*

A re-epitelização, é um processo crucial durante a fase inicial da cicatrização de feridas, e ocorre não apenas pela migração e proliferação de queratinócitos na camada epidérmica da pele a partir da borda de um ferimento, mas também pela diferenciação de células-tronco que residem no bulbo de folículos capilares (Nagato et al., 2006). A re-epitelização rápida após um ferimento proporciona o ambiente ideal para a cicatrização, incluindo um *scaffold* de células e vários fatores de crescimento, indispensáveis para o processo de cicatrização de feridas (Nagato et al., 2006).

1.1.2.3 *Contração do tamanho do ferimento*

Juntamente com a re-epitelização, a contração do tamanho do ferimento é outro processo importante na fase inicial da cicatrização. Ela minimiza a área aberta, puxando o tecido vizinho em direção ao centro da ferida. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos (Tomasek et al, 2002). Os miofibroblastos, que surgem por diferenciação dos fibroblastos, geram a força contrátil pela qual a área da ferida se contrai durante a cicatrização (Moulin e Plamondon, 2002). Esse processo ocorre mais rapidamente do que a re-epitelização, porque não há proliferação de células envolvidas.

1.1.3 **Fase de Remodelamento**

Por volta do décimo dia (ver Figura 1), o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, com a rede capilar atravessando e a rede linfática em regeneração (Plikus et al., 2017). O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno tipo I e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz (Tsai et al., 2017). Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparece (observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais), formando-se finalmente a cicatriz. Este processo ocorre lentamente, levando meses ou às vezes anos (Tsai et al., 2017).

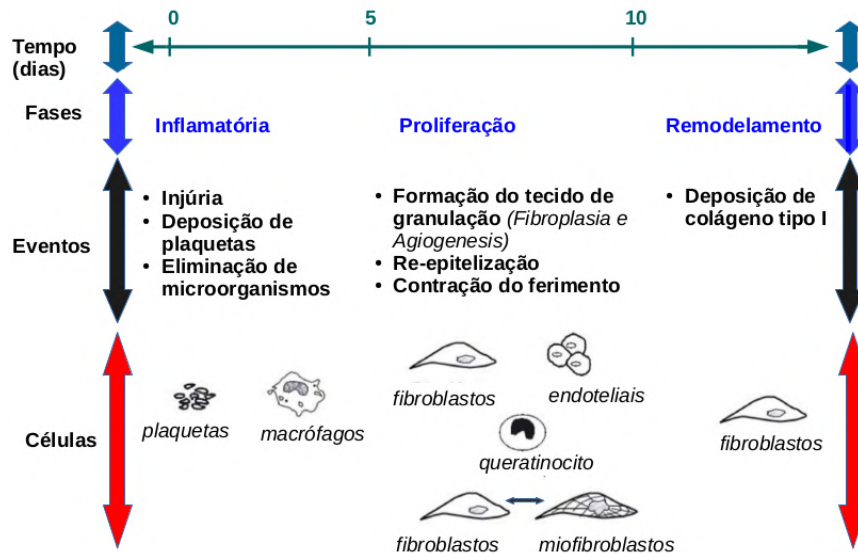


Figura 1: Linha do tempo da cicatrização de feridas ilustrando os três tipos de fases, chegada dos diferentes tipos de células e ocorrência dos principais eventos.

1.2 Processo anormal de cicatrização de feridas cutâneas

Como foi discutido anteriormente, o processo de cicatrização normal de feridas cutâneas pode ser categorizado em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. Portanto, alguma alteração imprevista destas fases pode resultar numa ferida crônica ou na formação excessiva de cicatrizes anormais.

Na fase inflamatória, macrófagos M1 e M2 desempenham um papel muito importante para fagocitar e estimular a formação da matriz extracelular. Estudos crescentes têm mostrado que a população de macrófagos M1 é a grande predominante nos primeiros instantes da formação de cicatrizes (fase inflamatória e proliferação precoce), enquanto a população M2 é a principal na fase final da formação de cicatrizes (fase de remodelação e proliferação tardia) (Novak e Koh, 2013). Chen, et al 2019, mostraram que a após a injúria do endotélio, a ativação e proliferação entre, 0-14 dias para M1 e 14-28 dias para M2, é caracterizada por uma alta proliferação de macrófagos, sugerindo que o desequilíbrio de M1/M2 durante o processo de cicatrização pode resultar na formação patológica de cicatrizes. Nesse sentido, estudos têm focado nas diferentes distribuições das populações M1 e M2 durante a cicatrização de feridas cutâneas (Shaker et al., 2011). Em um estudo recente, Xu et al., 2020, mostraram que o decréscimo da proliferação de macrófagos M1 na fase inicial (0-14 dias), pode reduzir a fase inflamatória resultando na formação de cicatrizes hipertróficas (*hypertrophic scar*, *HTS*). De fato, nessas condições os níveis

de citocinas pró inflamatórias, tais como TNA-alfa, CCL-2 e IL-1-beta, se mantiveram baixos em comparação com aqueles com cicatrização normal (van den Broek et al., 2015). Adicionalmente, os níveis de proteínas inflamatórias em cicatrizes hipertróficas (HTS), incluídas IL-6 e CCL2, também foram significativamente baixos (Butzelaar et al., 2006).

Quando a proliferação dos macrófagos M2 é retardada e prolongada na fase final (de 14-28 dias), as células apresentam um potencial indesejável para formação de cicatrizes patológicas (Xu et al., 2020). Um estudo de uma lesão renal crônica mostrou que os macrófagos M2 sofreram uma transição predominantemente de macrófagos para miofibroblastos (Wang et al., 2017). A maioria das células de transição macrófagos para miofibroblastos foram umas das principais fontes de fibroblastos produtores de colágeno no rim fibroso, representando mais de 60 % das células alfa-SMA originadas de macrófagos (Wang et al., 2016). Em outro estudo prospectivo (Butzelaar et al., 2006), os autores tomaram biópsias após a incisão e investigaram os níveis de macrófagos M2 no meio local de cicatrização de feridas. Durante o período da cicatrização após dias, o grupo de pacientes que desenvolveu cicatrizes hipertróficas (HTS), apresentou macrófagos M2 de linha de base mais elevado (CD68+, CD206+) em comparação com pacientes que desenvolveram cicatrizes normais (Butzelaar et al., 2006).

Foi demonstrado que a predisposição genética e a lesão da pele desempenham um papel importante na formação de queloides (Yuan et al., 2019). Diferente da cicatriz hipertrófica, queloides são feridas de tumor fibroproliferativo induzido como cicatrizes humanas que são caracterizados pela excessiva fibrose dérmica (deposição excessiva de matriz extracelular, especialmente colágeno) (Arno et al., 2014). Embora estudos de macrófagos na formação de queloides ainda sejam escassos, sabe-se que macrófagos M2 (CD163+) e fatores de crescimento, como TGF-beta, EGF, PDGF, VEGF, e IGF-1 (Lee e Jang, 2018), foram encontrados em abundância nos tecidos com queloides em relação à pele normal (Bagabir et al., 2012). Após a lesão da pele, Jin et al., 2018. mostraram que genes e proteínas associados a macrófagos M1 foram menos elevados em tecidos de queloides em relação a genes e proteínas associados a macrófagos M2. Em adição, Li et al 2017, sugeriram que o incremento de M2 e o decréscimo de M1 desempenham um papel vital na formação de queloides.

Em relação a fase de proliferação e remodelação, fibroblastos em queloides são mais sensíveis a citocinas de fatores de crescimento liberados por M2 do que os fibro-

blastos normais da pele, levando à alta expressão de colágeno (Plikus et al., 2017). Na região superficial da derme em queloides, um grão infiltrado celular foi encontrado, incluindo células fibroblastos, macrófagos M2 (CD163+) (Huang et al., 2014), junto com um aumento do número de fibras horizontais de colágeno e microvasos. A inflamação perivascular foi observada ao redor dos microvasos da derme subpapilar e papilar na lesão do quelóide (Bux e Madaree, 2010). Por outro lado, estudos têm demonstrado que, no processo de formação de queloides, a replicação genética é regulada em células endoteliais vasculares, sugerindo que a angiogênese em queloides é reduzida (Zheng et al., 2021). De fato, existem estudos que provaram a redução de vasos sanguíneos em queloides (Wang et al., 2017). A redução dos vasos sanguíneos leva à formação de um microambiente local hipóxico em queloides. Estudos mostraram que a hipóxia pode levar ao aumento da deposição de colágeno (Mingyuan et al., 2017). Portanto, os autores sugerem que a regulação da replicação genética das células endoteliais vasculares em queloides pode promover diretamente a deposição de colágeno (Zheng et al., 2021). Em adição, outros estudos têm mostrado que as células endoteliais vasculares em queloides podem também secretar citocinas para regular fibroblastos, promover a diferenciação em miofibroblastos, e indiretamente, promover a deposição de colágeno (Kiya et al., 2017) .

Em resumo, estudos têm sugerido que as cicatrizes hipertróficas e queloides podem ser consideradas como fases sucessivas da mesma doença fibroproliferativa da pele, com diferentes graus de inflamação que podem ser afetados pela predisposição genética (Huang et al., 2014). Portanto, avançar em novas abordagens que promovam um balanço adequado dos macrófagos M1/M2 no processos inflamatório e uma deposição adequada da matriz extracelular através das células endoteliais e fibroblasto nos processos de proliferação/remodelação apresenta importância significativa. Dentre essas abordagens, encontra-se aquela envolvendo o uso das nanopartículas de prata e seu potencial citotóxico dose e tempo dependentes.

1.3 Nanopartículas de Prata

Devido aos recentes avanços em síntese de nanopartículas de prata (*AgNPs*), tais como o método químico, físico e biológico, é possível produzir *AgNPs* de 20 mil até 15 mil átomos, numa faixa de tamanhos de, aproximadamente, 1 a 100 *nm* de diâmetro (Naganthran et al, 2022, Hulkoti e Taranath , 2017). Em geral, *AgNPs* podem ser

produzidas com diferentes tamanhos, formas, cargas superficiais e estruturas de núcleo (ver Figura 2) (Loiseau et al., 2019 e Helmlinger et al., 2016). Estas características morfo-elétricas das *AgNPs* são aproveitadas e aplicadas em uma ampla gama de funções no setor agrícola, industrial e médico (Dikshit et al., 2021).

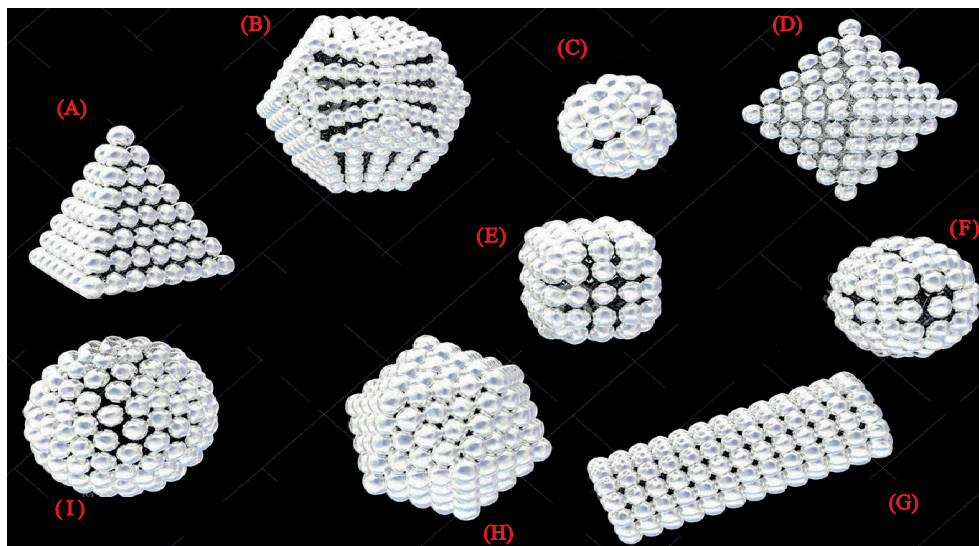


Figura 2: Nanopartículas de prata com diferentes formas: (A) pirâmide, (B) decaedro, (C) esfera pequena, (D) bi-pirâmide, (E) cubo, (F) esfera mediana, (G) bara, (H) octaedro truncado e (I) esfera grande (Dykman et al., 2011, Koczur et al., 2015 e Bulavinets et al., 2018). Figura adaptada e modificada de “shape of silver nanoparticle”, Dreamstime.com.

Na indústria médica, as nanopartículas de prata, devido a suas propriedades antibacterianas, antivirais, e anti-inflamatórias, são usadas como agentes terapêuticos (Xu et al., 2020). Adicionalmente, no campo de produção de vacinas, as *AgNPs* apresentam vantagens sobre vacinas tradicionais (García-Álvarez et al., 2018).

1.3.1 Propriedade Antitumoral

Apesar destas propriedades, existem debates acerca dos efeitos toxicológicos das nanopartículas de prata. Por um lado, efeitos toxicológicos graves foram relatados em sistemas de modelos *in vivo* e *in vitro* (Zanette et al., 2011 e Castiglioni et al., 2014), e por outro, resultados de investigação atuais atestam que a citotoxicidade inerente das *AgNPs* pode se tornar uma ferramenta útil para as células tumorais. De fato, o efeito citotóxico das *AgNPs*, pode induzir apoptose de células tumorais através da inativação de proteínas e regulação de vias de sinalização, ou bloqueio da metástase celular tumoral inibindo a angiogênese dentro da lesão (Yang et al., 2016). Em um outro estudo, Nguyen e colegas

(Nguyen, et al 2021), demonstraram que nanopartículas esféricas de *AgNPs* com diâmetro de 10.72 nm inibiu efetivamente a proliferação de células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e câncer de mama (MCF-7). Em outro estudo semelhante, Narasimha et al, sintetizaram *AgNPs* de extrato de folha de eucalipto globuloso para tratar linhas de células tumorais colorretais (HCT116). As nanopartículas de prata com 20 nm e forma esférica, atuaram no ciclo celular aumentando a expressão de genes apoptóticos e diminuindo a expressão de marcadores antiapoptóticos.

1.3.2 Reparo de feridas

Estudos *in vivo* confirmaram uma cicatrização mais rápida pela aplicação de *AgNPs* em feridas de pele em modelos utilizando camundongos, através da ativação de macrófagos promovendo e modulando a fase inflamatória (You et al., 2017). Outro estudo evidenciou que as *AgNPs* não apenas possuem um efeito benéfico sobre o processo de cicatrização em ferimentos, mas também melhorou as propriedades elásticas da pele reparada, que se assemelhavam a pele normal (Kwan et al., 2011). Foi sugerido que esse efeito decorre da habilidade das *AgNPs* na regulação dos fibroblastos, na deposição de colágeno tipo I e III, bem como no direcionamento para o alinhamento adequado da matriz de colágeno e o arranjo espacial (formação do tecido de granulação). Além disso, estudos *in vitro* da exposição de *AgNPs* em células fibroblasto, mostraram um decréscimo de citocinas como TNF-alfa e IL-12, e do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor, VEGF*) (Franková et al., 2016), regulando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos que possuem habilidade para a contração do ferimento (You et al., 2017). Outro estudo mostrou que as *AgNPs* podem mediar diferentes eventos bioquímicos em queratinócitos e aumentar sua taxa de proliferação após o ferimento (re-epitelização) (Liu, et al., 2010). Adicionalmente, foi mostrado que as *AgNPs* podem modular a angiogênese excessiva em células endoteliais (Castiglioni et al., 2014).

Apesar destes avanços, mecanismos biológicos subjacentes sobre como as nanopartículas de prata podem modular o metabolismo dos macrófagos em respostas inflamatórias, dos fibroblastos na produção de colágeno e na diferenciação em miofibroblastos, assim como das células endoteliais na angiogênese são ainda pouco entendidas. Nesse sentido, caracterizar o metabolismo de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais tem se tornado, recentemente, uma necessidade para se compreender o potencial terapêutico

das nanopartículas de prata para o tratamento das feridas. Entender como se processa a ativação de células em resposta a citotoxicidade induzida pelos íons de prata na forma dose e tempo dependentes, através do estudo de vias metabólicas fundamentais, como glicólise, ciclo do ácido cítrico (TCA), metabolismo de aminoácidos, dentre outras (Nonnenmacher e Hiller, 2018), pode gerar avanços significativos no processo de cicatrização de feridas cutâneas. Por exemplo, um tratamento com *AgNP* no tempo poderia controlar a proliferação dos macrófagos M1/M2 nos primeiros instantes do processos inflamatório, propiciar uma deposição adequada da matriz extracelular através da modulação da proliferação e remodelação das células endoteliais e fibroblasto, restringindo a formação de tumores fibroproliferativos (quelóides) ou cicatrizes hipertróficas (HTS).

A Metabolômica, baseada em espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$) e espectrometria de massa (EM), são ferramentas espectroscópicas particularmente poderosas para investigar o metabolismo de células (Liu et al., 2017), pois permitem a detecção direta de uma ampla gama de metabólitos identificados como marcadores em resposta a células ativadas ou estimuladas pelas *AgNPs* e, consequentemente, as mudanças nas vias metabólicas ativadas pelos tratamentos dose e tempo dependentes, através de comparações diretas com o caso controle (ou basal).

1.3.3 Corona de proteína

É demonstrado, que dependendo da biodistribuição e captação celular de nanopartículas de prata, diferentes efeitos citotóxicos e eventos metabólicos podem ser induzidos (Lategan et al., 2019 e Tak et al., 2015). Portanto, avançar em novas abordagens que promovam uma internalização mais adequada ou mais fácil das *AgNPs* por macrófagos, fibroblastos e endotélios é importante. Quando as *AgNPs* entram em contato com proteínas ou biomoléculas, estas são rapidamente absorvidas nas superfícies das nanopartículas, formando uma corona biomolecular dura (García-Álvarez, et al 2018). Esta nova entidade biológica de nanopartículas adquire uma nova identidade, que tem afinidade específica para sua proteína receptora na membrana celular (Ma et al., 2020). De fato, estratégias de entrega de drogas têm sido realizadas nos últimos anos sobre essa nova entidade (Mariam et al., 2016). Estudos mostraram que a adsorção de biomoléculas pode alterar a identidade das *AgNPs* como tamanho, forma e estado de aglomeração (Sasidharan et al., 2015). Como consequência, mudanças na captação celular, localização in-

tracelular, acúmulo de tumores e toxicidade foram relatadas (Karmali and Simber, 2011). Nesse cenário, é importante entender as interações que ocorrem na interface da corona.

1.4 Objetivos

Os sistemas celulares em estudo nesta tese de doutorado consiste em linhagens de células que participam no processo de cicatrização de feridas como os macrófagos murinos (RAW 267.1), fibroblasto humanos (FN1) e células endoteliais microvasculares humanas (HUV-VE-C), assim como as nanopartículas de prata (*AgNPs*) e o meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB).

Nesta tese de doutorado:

- As propriedades morfo-elétricas das *AgNPs* em um meio nutricional comumente utilizado para cultura celular (SFB+DMEM), foram avaliadas em diferentes concentrações e tempos de incubação, através de espalhamento de luz dinâmica, “zeta-potencial”, espalhamento de raios-X a baixo ângulo, espectroscopia de absorção UV-vis e imagens de turbidez. Nosso primeiro objetivo é demonstrar que a capacidade das proteínas e biomoléculas do meio de cultura suplementado para se aderirem às células pode ser usada para internalizar mais facilmente as nanopartículas de prata, *AgNPs* nos macrófagos, fibroblastos e endotélios.
- A avaliação das alterações metabólicas nos extratos celulares (endometaboloma) e meio de cultura (exometaboloma) de macrófagos, fibroblastos e endotélios quando estas são expostas a diferentes concentrações de *AgNPs* e tempos de incubação, obtida a partir de ensaios citotóxicos e metabolômicos com base na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$). Nosso objetivo é demonstrar que a citotoxicidade inerente das *AgNPs* pode ser usada para controlar a taxa de eventos celulares durante o processo de cicatrização da ferida para prevenir ou tratar efeitos indesejáveis como surgimento de queloides. Para este propósito, é imperativo uma compreensão básica do crescimento celular sob efeito das nanopartículas e dos eventos metabólicos associados, que foram descritos aqui de forma quantitativa e qualitativa abordando vias metabólicas específicas.

1.5 Sumario dos Próximos Capítulos

No capítulo 2, apresentamos brevemente os princípios básicos das técnicas experimentais aplicadas no estudo do efeito das *AgNPs* sobre as diferentes linhagens celulares que participam na cicatrização e reparo tecidual. Devido ao número elevado de técnicas experimentais optamos por uma descrição resumida, apenas apresentando equações quando necessário. Nas seções (2.1), (2.2), (2.3), (2.4) e (2.5) foram descritas as técnicas utilizadas para a identificação de eventos metabólicos. Na seção (2.6), descrevemos a técnica que vai avaliar as taxas de crescimento e morte celular. Finalmente nas últimas seções (2.7), (2.8), (2.9) e (2.10) foram descritas as duas técnicas utilizadas para caracterizar a *AgNPs* em meio de cultura.

No capítulo 3, apresentamos a descrição dos materiais e métodos utilizados, o qual foi separado em quatro partes: na primeira, detalhamos os materiais utilizados (seção 3.1); na segunda parte, são descritos os protocolos de preparação das amostras (seção 3.2); na terceira parte descrevemos os detalhes dos controles experimentais para a formação do complexo *cel/AgNp* (seção 3.3); e na quarta parte, são descritos os métodos experimentais utilizados, bem como os equipamentos (seção 3.4).

O Capítulo 4 foi dividido em três partes: na primeira, analisamos os resultados de caracterização das *AgNPs* em meio de cultura (seção 4.1); na segunda parte analisamos o efeito citotóxico das *AgNPs* sobre os modelos celulares utilizados (seção 4.2). Na terceira e última parte, verificamos e identificamos as cadeias de eventos metabólicos desencadeados nos modelos celulares quando estes foram submetidos ao tratamento com *AgNPs* (seção 4.3) do tipo dose e tempo dependentes.

Por último, no capítulo 5, apresentamos as conclusões e perspectivas.

CAPÍTULO 2

“El destino no es cuestion de suerte, es cuestion de elección. No es algo a esperar, es algo a ser conseguido”

Willian Jennings Bryan

2 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Este capítulo apresenta princípios básicos das técnicas experimentais utilizadas ao longo do trabalho desta tese. Devido à variedade de técnicas experimentais aplicadas, estas serão aqui apresentadas de forma sucinta e direcionadas para nossos estudos.

2.1 Metabolômica

As últimas três décadas testemunharam uma nova era de pesquisas em ciências biológicas, graças às ciências ômicas, a qual permite uma compreensão aprofundada de qualquer sistema vivo, podendo ser um organismo, tecido, célula ou mesmo parte de uma célula (Karahalil, 2016). Por exemplo, através dos métodos conhecidos como genômica, transcriptômica, proteômica e lipidômica, pode-se estudar grandes quantidades de genes de ADN, ARN mensageiros, proteínas e lípidos (Tolani et al., 2021).

A metabolômica é outro método que tem sido aplicado satisfatoriamente em muitas áreas das ciências da vida, através do estudo de moléculas pequenas chamadas metabólitos. Coletivamente, o agrupamento de metabólitos (50 - 1500 *Da* - açúcares, aminoácidos, etc.) dentro de um sistema biológico, é conhecido como metaboloma (Savolainen et al., 2017). O metaboloma é inerentemente dinâmico, já que as pequenas moléculas estão continuamente sendo absorvidas, sintetizadas, degradadas e interagindo com outras moléculas como resultado do metabolismo celular intermediário (Burton e Ma, 2019). O metabolismo celular é organizado em diferentes vias metabólicas, as quais são caracterizadas por uma série de reações químicas, catalisadas por enzimas, tal que, o produto de uma reação torna-se o substrato para a seguinte reação (Beale et al., 2018).

A metabolômica tem como objetivo analisar o comportamento dinâmico do metaboloma, através de mudanças nas vias metabólicas que os processos celulares executam continuamente, permitindo aos pesquisadores investigar doenças, suas causas e possíveis tratamentos de maneira aprofundada (Savolainen et al., 2017). De forma geral, para detectar/quantificar flutuações nas vias metabólicas, o chamado metaboloma, tem que apresentar uma perturbação ou estímulo, como por exemplo, através de uma doença, de

um efeito tóxico, uma droga farmacêutica ou um nanomaterial (Liu et al., 2017). Assim, a descrição abrangente das alterações nos metabólitos, através da metabolômica, tem o potencial de revelar desvios imprevistos da homeostase e identificar novos marcadores de efeito de conexão para diagnóstico e prognóstico que não são clinicamente evidentes (Jelonek e Widłak, 2018). Por exemplo, a aplicação da metabolômica em pesquisa biomédica tem logrado êxito em descobrir uma variedade de biomarcadores para doenças tais como risco para a diabetes (Liu et al., 2017), doença cardíaca (Shah et al., 2012) e cancer (Mehta et al., 2017), propiciando dessa forma o progresso para uma variedade de terapias.

Trabalhos recentes têm demonstrado o potencial de aplicação da metabolômica para inferir o *status metabólico* de linhagens distintas de células de melanoma (Triba, et al., 2010; Bloise, et al., 2014). Bloise et al. empregaram a Metabolômica para avaliar o impacto da proteína da galactina-3 no metabolismo celular de células tumorigênicas de melanomas murinos, particularmente na via metabólica glicolítica e na homeostase mitocondrial, quando estas são cultivadas sob condições particulares de hipóxia normóxia em meios de cultivo com diferentes níveis de glicose (Bloise, et al., 2014). Outra área de desenvolvimento na qual a metabolômica tem se destacado é na agricultura. O metaboloma de plantas são inesperadamente complexos, sendo estimado que entre 200.000 moléculas já foram detectadas (Fiehn, 2002). Entender a metabolômica em plantas já tem entregado muitos resultados importantes, tais como a detecção de efeitos não desejados de produtos alimentícios modificados geneticamente ou quando estas são expostas a toxinas conhecidas (Dixon et al., 2006). Em mamíferos, o potencial da metabolômica é enorme, particularmente no estudo entre nosso universo químico e a biologia humana. Os humanos estão provavelmente expostos entre 1-3 milhões de produtos químicos discretos em nossa vida, e muitos daqueles xenobióticos são metabolizados por nosso corpo para torná-los menos tóxicos. Por esta razão, a metabolômica está sendo desenvolvida como uma plataforma para o estudo e prevenção de toxicidades de drogas durante o desenvolvimento pré-clínico (Lindon et al., 2007).

As principais plataformas analíticas utilizadas em estudos metabólicos estão baseadas nos instrumentos de espectroscopia ressonância magnética nuclear (^1H -RMN) e espectrometria de massa (EM), assim como uso de métodos estatísticos de análise de informação ou *data science* do termo em inglês (Ver Figura 3). As técnicas de RMN e EM permitem uma detecção simultânea de dezenas a centenas de metabólitos em mis-

turas complexas como biofluidos e extratos de tecido/célula, fornecendo uma abordagem holística que é claramente mais poderosa do que a medição de alguns metabólitos pré-estabelecidos por métodos bioquímicos clássicos (Carrola, et al., 2020 e Sinclair, et al., 2019). O tratamento de dados por estatísticas multivariadas é tipicamente empregado para lidar com a complexidade dos dados e pesquisar padrões de variação consistentes ou construir modelos de classificação (Carrola et al., 2020).

Nas próximas seções, descreveremos brevemente e de forma dirigida para nosso estudo de metabolômica a ^1H -RMN, estatística multivariada (PLS-DA) e vias metabólicas, enfatizando conceitos que são importantes para simplificar o entendimento dos temas propostos neste trabalho.

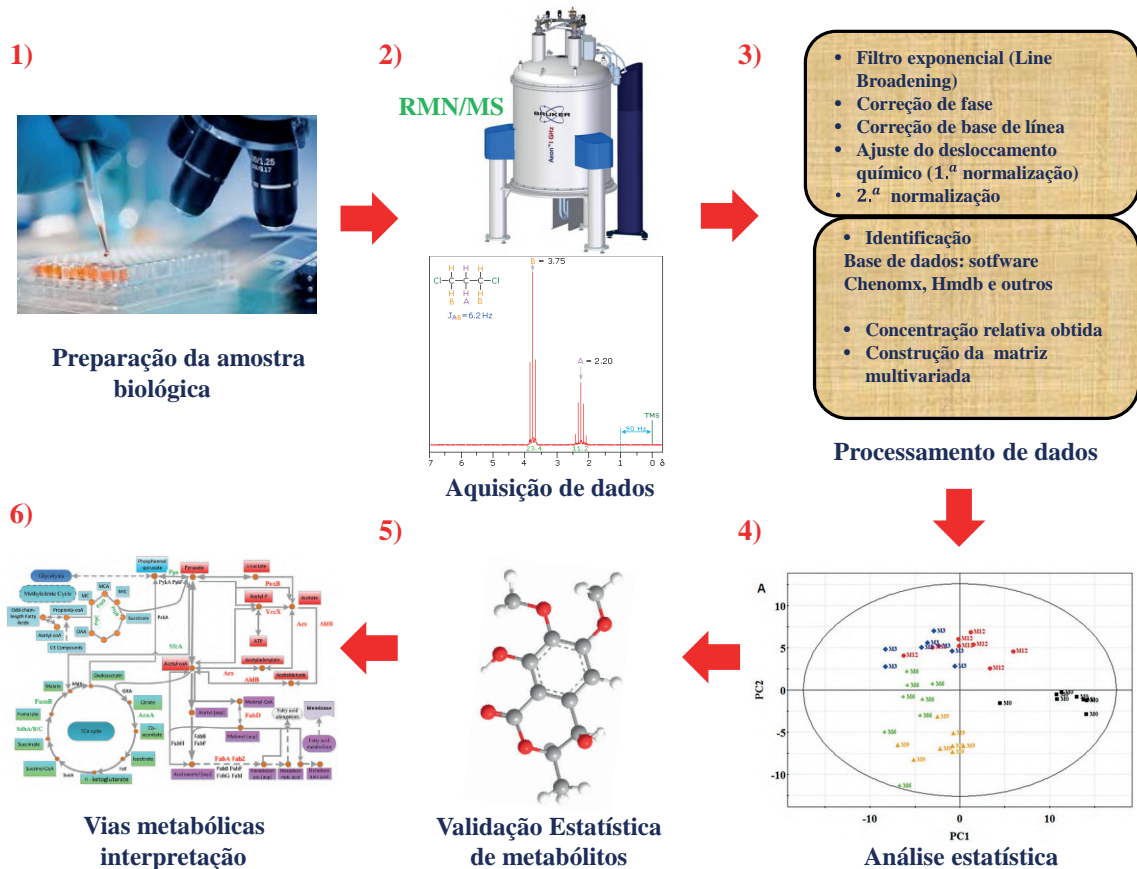


Figura 3: *Visão geral da plataforma analítica Metabolômica*

2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons ($^1\text{H-RMN}$)

A metodologia de RMN aplicada à sistemas diamagnéticos tem como objetivo extrair informações sobre as propriedades dinâmicas e estruturais dos materiais. Para isso, é preciso conhecer a relação existente entre as principais interações de spin nuclear e os parâmetros moleculares, em particular a dependência da frequência de precessão dos spins com a orientação dos segmentos moleculares. Portanto, a seguir uma discussão resumida será apresentada sobre as interações de spin nuclear, iniciando pelos Hamiltonianos que descrevem tais interações.

2.2.1 Relação entre o spin nuclear e o momento magnético nuclear

Considere-se um sistema de esferas carregadas, as quais se comportam como pequenos planetas que estão constantemente girando ao redor de seu eixo. Esta movimentação faz com que estas esferas apresentem um momento angular (\vec{L}^i). De acordo, com o eletromagnetismo uma carga em movimento pode gerar um campo magnético denominado momento de dipolo ($\vec{\mu}^i$). A relação entre, \vec{L}^i e $\vec{\mu}^i$, é dada (ver Jackson, 1976) segundo a equação, $\vec{\mu}^i = \frac{qq}{2M}\vec{L}^i$, onde i é inesima esfera, q , M e g , são carga, massa e o fator que depende da configuração da esfera.

Um sistema nuclear é um sistema físico complexo constituído de núcleons (prótons e nêutrons). As propriedades mecânica quânticas dos núcleons incluem o momento angular intrínseco (spin) e carga positiva dos prótons, sendo a relação entre o spin do núcleo (I) e o momento de dipolo magnético nuclear dada pela equação (2.1) (Buxton, 2002),

$$\vec{\mu}^i = -\gamma\hbar\vec{I}^i \quad (2.1)$$

sendo γ a razão giromagnética, \hbar , a constante de Planck e \vec{I}^i o spin nuclear do i-ésimo núcleo.

2.2.2 O Hamiltoniano e as diferentes interações em RMN

O Hamiltoniano de spin nuclear total pode ser descomposto em uma soma de várias parcelas correspondentes às diversas interações de spin nuclear a que o núcleo pode

estar submetido. Levando em conta as interações mais comuns em RMN, o Hamiltoniano de spin nuclear pode ser escrito como (ver, Ribeiro de Azevêdo, 2001 e Slichter, 1990):

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{RF} + \hat{H}_{DQ} + \hat{H}_{JC} + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (2.2)$$

onde \hat{H}_Z , \hat{H}_{RF} , \hat{H}_{DQ} , \hat{H}_{JC} , \hat{H}_D e \hat{H}_Q , representam, os hamiltonianos correspondentes as interações Zeeman Nuclear, interação do sistema de spins com campos de radiofrequência, interação do deslocamento químico, interação de acoplamento entre spins, interação dipolar magnética e a interação quadrupolar elétrica. É importante mencionar que nesta tese de doutorado levaremos em conta as interações mais comuns em RMN de estado líquido, uma vez que neste trabalho somente amostras dessa natureza estão sendo analisadas. Portanto, o Hamiltoniano mostrado na, equação (2.2), poderá ser reduzido como, $\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{DQ} + \hat{H}_{JC} + \hat{H}_{RF}$.

A contribuição dipolar magnética entre os momentos dos spins é anulada, devido a constante movimentação dos núcleos que a promediará para valores próximos de zero. Já a contribuição quadrupolar elétrica não se faz presente devido ao fato de estar trabalhando com núcleos de hidrogênio, os quais possuem spin menor ou igual a 1/2, e que portanto não apresentam momento quadrupolar elétrico que ocorre somente para núcleos com spin maior que 1/2.

A seguir, serão feitas algumas considerações sobre as interações de spin mais importantes envolvidas na espectroscopia de RMN (Carlos Bloise, 2002) as quais são:

- Interação Zeeman Nuclear: tem origem no acoplamento do momento nuclear dos nucleos, $\hat{\mu}^i = \gamma \hbar \hat{I}^i$, com o campo magnético estático externo $\vec{B}_0 = B_0 \hat{z}$. O Hamiltoniano que respresenta essa interação pode ser escrito como,

$$\hat{H}_Z = - \sum_i \hat{\mu}^i \cdot \vec{B}_0 = - \sum_i (\gamma^i \hbar B_0) \hat{I}_z^i \quad (2.3)$$

A soma sobre i cobre todos os núcleos da amostra.

- Interação de deslocamento químico: tem origem no acoplamento entre o spin nuclear e os campos magnéticos produzidos pelas correntes induzidas nas nuvens eletrônicas, devido a aplicação do campo magnético externo B_0 . O Hamiltoniano,

pode ser representado como,

$$\hat{H}_{DQ} = - \sum_i \hat{\mu}^i \cdot \vec{B}_{indu} = - \sum_i \hat{\mu}^i \cdot (\sigma^i \cdot \vec{B}_0) = -\gamma^i \hbar \sum_i \hat{I}^i \cdot \sigma^i \cdot \vec{B}_0 \quad (2.4)$$

onde, σ^i , representa um tensor simétrico de segunda ordem, denominado tensor de deslocamento químico que caracteriza a blindagem do i -ésimo sitio nuclear por sua nuvem eletrônica.

- Acoplamento Spin-Spin : Tem origem na interação entre o spin nuclear de um núcleo com os dos núcleos vizinhos através da polarização dos elétrons das ligações químicas que ocorre devido aos momento de dipolos magnéticos dos núcleos envolvidos. É importante mencionar que o acoplamento J , é independente do campo magnético \vec{B}_0 . O Hamiltoniano que representa essa interação pode ser escrito como,

$$\hat{H}_{JC} = 2\pi\hbar \hat{I}^i \cdot J_{ik} \cdot \hat{I}^k \quad (2.5)$$

onde J_{ik} é o tensor de J-acoplamento e \hat{I}^i , \hat{I}^k são os spins nucleares de diferentes núcleos.

- Interação com o campo de radiofrequência : Tem origem no acoplamento do spin nuclear com o campo magnético oscilante aplicado perpendicularmente a \vec{B}_0 e com frequência ω_0 , que se encontra na faixa de radiofrequência,

$$\vec{B}_{RF} = 2B_1(t)\cos(\omega_{RF}t + \phi)\hat{x} \quad (2.6)$$

$$\hat{H}_{RF} = - \sum_i (\gamma^i \hbar \hat{I}^i) \cdot \vec{B}_{RF} = -\hbar \cos(\omega_{RF}t - \phi) \sum_i |\gamma^i B_1(t)| \hat{I}_x^i \quad (2.7)$$

onde $B_1(t)$, ω e $\phi(t)$ são, respectivamente, a amplitude, a frequência e a fase do campo de RF.

Como já mencionado, a origem física da interação de deslocamento químico esta na blindagem dos núcleos (I^i) pelas correntes eletrônicas que surgem devido a aplicação do campo magnético \vec{B}_0 . Como veremos mais adiante, esta contribuição provocará mudanças na frequência de ressonância para aqueles núcleos.

A equação (2.4), que descreve o Hamiltoniano de deslocamento químico pode ser reformulada em termos dos tensores cartesianos irredutíveis, como mostrado na equação (2.8),

$$\hat{H}_{DQ} = \gamma^i \hbar \begin{pmatrix} I_x(i) \\ I_y(i) \\ I_z(i) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ B_0 \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

e de uma forma mais geral como:

$$\hat{H}_{DQ} = (\gamma^i \hbar B_0) \sum_u^{\text{eixos}} \sum_v^{\text{eixos}} \hat{\sigma}_{uv}(i) \cdot \hat{I}_u(i) \cdot \hat{B}_v = C_i \cdot \hat{\sigma}(i) \cdot \hat{X}(i) \quad (2.9)$$

onde C_i é o fator que depende das constantes (γ^i, \hbar, B_0) , entretanto, $\hat{\sigma}(i)$ e $\hat{X}(i)$ são os tensores cartesianos de deslocamento e de spin-campo que dependem do fator geométrico e do spin.

A fim de simplificar a solução da equação anterior, iremos empregar a representação que se utiliza da forma de esféricos irredutíveis. Desta forma, a equação (2.9) pode ser reescrita como,

$$\hat{H}_{DQ} = C_i \sum_{l=0}^2 \sum_{m=-l}^l (-1)^m \sigma_l^{-m}(i), X_l^m(i) \quad (2.10)$$

Para dar solução à equação (2.10), devemos ter em consideração os tensores, $\sigma_l^{-m}(i)$ e $X_l^m(i)$, em sua forma esférica irredutível, os quais podem ser encontrados na Tabela 1 (Carlos Bloise, 2018).

Tabela 1: *Elementos do tensor de deslocamento químico (SEP) e spin-campo (RL) na representação esférica irredutível.*

Tensor de deslocamento químico No sistema de eixos principais (SEP)	Tensor spin-campo No sistema de laboratório (RL)
$\sigma_0^0 = -\frac{1}{\sqrt{3}} Tr(\hat{\sigma}) = -\sqrt{3} \sigma_{iso}$	$X_0^0 = -\frac{1}{\sqrt{3}} I_z(i)$
$\sigma_1^0 = -\frac{i}{\sqrt{2}} (\sigma_{xy} - \sigma_{yx}) = 0$	$X_1^0 = 0$
$\sigma_1^{\pm 1} = -\frac{1}{2} [\sigma_{zx} - \sigma_{xz} \pm i(\sigma_{zy} - \sigma_{yz})] = 0$	$X_1^{\pm 1} = -\frac{1}{2} I_{\pm}(i)$
$\sigma_2^0 = \frac{1}{\sqrt{6}} [3\sigma_{zz} - Tr(\hat{\sigma})] = \sqrt{\frac{3}{2}} \delta_{zz}$	$X_2^0 = \sqrt{\frac{2}{3}} I_z(i)$
$\sigma_2^{\pm 1} = \mp \frac{1}{2} [\sigma_{xz} + \sigma_{zx} \pm i(\sigma_{yz} + \sigma_{zy})] = 0$	$X_2^{\pm 1} = \mp \frac{1}{2} I_{\pm}(i)$
$\sigma_2^{\pm 2} = \frac{1}{2} [\sigma_{xx} - \sigma_{yy} \pm i(\sigma_{xy} + \sigma_{yx})] = \frac{3}{2} \delta_{zz} \eta$	$X_2^{\pm 2} = 0$

É importante que na expressão acima (2.10), todas as quantidades tensoriais este-

jam expressas em um sistema de coordenadas único, que deve ser, a principio o sistema de eixos de laboratório (RL), definido pela direção do campo magnético externo \vec{B}_0 . Da Tabela 1, podemos ver que os $X_l^m(i)$, já estão no sistema de laboratório. Por outro lado, os $\sigma_l^{-m}(i)$, estão expressos no SEP. Deste modo, para expressar, H_{DQ} , no sistema de laboratório deve-se encontrar a transformação de coordenadas que relacione o mesmo com o SEP. No caso dos elementos tensoriais esféricos irredutíveis, essa transformação pode ser escrita em termos das matrizes de rotação de Wigner $D_{m,m'}^l(\alpha, \beta, \theta)$ através da seguinte expressão:

$$\sigma_l^{-m}(RL) = \sum_{m'} D_{m,m'}^l(\alpha, \beta, \theta) \sigma_l^{-m'}(SEP) \quad (2.11)$$

onde α , β e θ , são os ângulos de Euler entre o sistema referencial de laboratório (RL) e o SEP. Após este processo esta transformação entre os dois sistemas de eixos, o resultado da soma do hamiltoniano da equação (2.11), pode ser escrito de forma geral como:

$$\hat{H}_{DQ} = C_i [\sigma_0^0(i) \cdot X_0^0(i) + \sigma_2^0(i) \cdot X_2^0(i)] \quad (2.12)$$

onde os valores de, $X_0^0(i)$ e $X_2^0(i)$, podem ser obtidos da Tabela 1. Entretanto, com o uso da equação de transformação de coordenadas, $\sigma_0^0(i)$ e $\sigma_2^0(i)$ podem ser escritos como:

$$\sigma_0^0(RL) = \sqrt{3} \sigma_{iso} \quad (2.13)$$

$$\sigma_2^0(RL) = \sqrt{\frac{3}{8}} \delta_{zz} [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos^2 \theta] \quad (2.14)$$

onde, $\sigma_0^0(i)$, é invariante sob rotação, e $\sigma_2^0(i)$, variante.

Utilizando os valores mostrados na parte de acima, o Hamiltoniano secular da interação, H_{DQ} , pode ser escrito de uma forma geral como:

$$\hat{H}_{DQ} = C_i (\hat{I}_z \cdot \sigma_{iso} + \frac{\hat{I}_z \cdot \delta_{zz}}{2} [(3 \cos^2 \beta - 1) + \eta \sin^2 \beta \cos^2 \theta]) \quad (2.15)$$

onde o primeiro termo será chamado componente isotrópica e o segundo componente anisotrópica. Para RMN em estado líquido, a dependência angular (β, θ) entre o campo

magnético aplicado, \vec{B}_0 , e campo magnético induzido, \vec{B}_{ind} , apresenta na média o valor nulo, $\langle \beta, \theta \rangle \approx 0$, isto, pela constante movimentação dos núcleos. Portanto, a contribuição anisotrópica para RMN em estado líquido é nula. Com isto, \hat{H}_{DQ} , se reduz para, $\hat{H}_{DQ} = \gamma^i \hbar B_0 \hat{I}_z \cdot \sigma_{iso}$.

Em campos magnéticos de alguns Teslas as intensidades dos campos locais sentidos pelos núcleos são pequenas em relação ao campo magnético principal, \vec{B}_0 . Desta modo, o desdobramento dos níveis Zeeman devido às interações internas podem ser tratados como uma perturbação de primeira ordem $\hat{H}_Z = \gamma^i \hbar B_0 \hat{I}_z$. Uma vez que os desdobramentos de energia em primeira ordem são dados por $E_m^{(1)} = \langle I, m | \hat{H}_{DQ} | I, m \rangle$, somente os termos de \hat{H}_{DQ} que são diagonais em $|I, m\rangle$ devem ser mantidos. Esta parte secular de \hat{H}_{DQ} corresponde apenas aquelas componentes que comutam com \hat{I}_z , e portanto, compartilham os mesmo $|I, m\rangle$ entre \hat{H}_{DQ} e \hat{H}_Z .

Considerando-se o Hamiltoniano composto pelo Hamiltoniano Zeeman e de deslocamento químico, tem-se:

$$\hat{H} = \gamma^i \hbar B_0 \hat{I}_z + \gamma^i \hbar B_0 \hat{I}_z \cdot \sigma_{iso}. \quad (2.16)$$

Os níveis de energia para RMN em estado líquido, de núcleos não acoplados com (spin $I = \frac{1}{2}$, $|1/2, m\rangle$), podem ser obtidas facilmente a partir dos autovalores do Hamiltoniano (2.16), resultando em (Sakurai e Napolitano, 2011):

$$E_i(m = \pm \frac{1}{2}) = \pm \frac{1}{2} [h \frac{\gamma^i B_0}{2\pi} (1 + \sigma_{iso}^i)]. \quad (2.17)$$

Para RMN em estado líquido a contribuição paramagnética geralmente não se manifesta, portanto, ao ter só contribuição diamagnética o valor de, σ_{iso}^i , será negativo. Além disso, será considerado $h = 1$. Portanto, a equação (2.17), é escrita como,

$$E_i(m = \pm \frac{1}{2}) = m\nu_i \quad (2.18)$$

onde, m , é o valor dos estados do spin ($+1/2$ e $-1/2$) e, $\nu_i = \frac{\gamma^i B_0}{2\pi} (1 - \sigma_i)$, é a frequência de Larmor que depende da razão giromagnética γ^i , deslocamento químico σ_i e do campo magnético aplicado B_0 .

- Para um núcleo com spin (1/2):

Da equação (2.18), pode-se mostrar que as energias dos respectivos estados (+1/2 e -1/2) do núcleo, são:

$$E_1(m = \pm \frac{1}{2}) = \pm \frac{1}{2} \nu_1 \quad (2.19)$$

Como se pode saber de outros tipos de espectroscopia, só certos tipos de transições são permitidas para partículas (núcleo, átomo, molécula ou elétron) quando estas são excitadas. Existem usualmente regras, chamadas "regras de seleção", sobre as quais as transições podem ter lugar; estas regras normalmente se referem aos números quânticos, os quais são característicos de cada estado ou nível de energia.

No caso de RMN, as regras de seleção se referem ao número quântico, m , (equação 2.18): só transições tal que $\Delta m = \pm 1$.

Sob o ponto de vista da mecânica clássica, o spin nuclear pode rotacionar, em módulo, um ângulo de 180° . No caso de um só spin nuclear, a mudança em, m , entre os dois estados é $((+1/2) - (-1/2) = 1)$. Portanto, a transição é permitida. Com uso da equação (2.19), podemos calcular a frequência da transição permitida.

$$\Delta E = E_1(-\frac{1}{2}) - E_1(+\frac{1}{2}) = -\nu_1 \quad (2.20)$$

- Para dois núcleos acoplados com spin (1/2):

Como visto na equação (2.5), o acoplamento escalar spin-spin, entre um spin nuclear com seus vizinhos é descrito através do hamiltoniano, \hat{H}_{JC} . O acoplamento escalar homonuclear para dois núcleos (1/2), consiste em dois dupletos, e seu Hamiltoniano pode ser escrito como ($\hat{H}_{JC} = 2\pi\hbar\hat{I}^1 \cdot J_{12} \cdot \hat{I}^2$).

Os níveis de energia e as correspondentes frequências de precessão podem ser calculadas a partir dos autovalores deste Hamiltoniano, \hat{H}_{JC} (James Keeler, 2002; Sakurai e Napolitano, 2011; Gil e Geraldes, 1987), resultando em:

$$E_{m_1 m_2} = m_1 \nu_1 + m_2 \nu_2 + m_1 m_2 J_{12} \quad (2.21)$$

onde, m_1 e m_2 , são os valores de, m , para os spins 1 e 2. As frequências de Larmor, são: $\nu_1 = \frac{\gamma^1 B_0}{2\pi} (1 - \delta_1)$ e $\nu_2 = \frac{\gamma^2 B_0}{2\pi} (1 - \delta_2)$ respectivamente.

Os valores de energia do sistema composto pelo acoplamento dois spins 1 e 2 podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2: *Valores de energia do sistema composto pelo acoplamento de dois spins.*

Numero	Estados de Spin 1 e 2	M = $m_1 + m_2$	Energia
1	$(+\frac{1}{2}, +\frac{1}{2})$	1	$+\frac{1}{2}\nu_1 + \frac{1}{2}\nu_2 + \frac{1}{4}J_{12}$
2	$(+\frac{1}{2}, -\frac{1}{2})$	0	$+\frac{1}{2}\nu_1 - \frac{1}{2}\nu_2 - \frac{1}{4}J_{12}$
3	$(-\frac{1}{2}, +\frac{1}{2})$	0	$-\frac{1}{2}\nu_1 + \frac{1}{2}\nu_2 - \frac{1}{4}J_{12}$
4	$(-\frac{1}{2}, -\frac{1}{2})$	-1	$-\frac{1}{2}\nu_1 - \frac{1}{2}\nu_2 + \frac{1}{4}J_{12}$

A regra de seleção para transições permitidas é a mesma vista anteriormente. No entanto, esta será aplicada para o numero quântico, M , o qual, é obtido através da soma dos valores de, m , para cada spin, resultando assim quatro estados de energia (ver a Tabela 2).

A regra de seleção é que $\Delta M = \pm 1$. O valor de M pode mudar para acima (positivo) ou para baixo (negativo) por uma unidade. Isto significa que as transições permitidas estão entre os níveis $1 \rightarrow 2$, $3 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 3$ e $2 \rightarrow 4$. As frequências emitidas são calculadas, a partir de ($\Delta E = E_{sup} - E_{inf}$). Por exemplo, a transição $1 \rightarrow 2$:

$$\nu_{12} = E_2 - E_1 \quad (2.22)$$

$$\nu_{12} = +\frac{1}{2}\nu_1 - \frac{1}{2}\nu_2 - \frac{1}{4}J_{12} - \left(\frac{1}{2}\nu_1 + \frac{1}{2}\nu_2 + \frac{1}{4}J_{12}\right) \quad (2.23)$$

$$\nu_{12} = -\nu_2 - \frac{1}{2}J_{12} \quad (2.24)$$

O conjunto completo de transição está mostrado na Tabela 3:

Tabela 3: *Valores das frequências emitidas de um estado (E_{sup}) para um (E_{inf}).*

Transição	Estados de spin 1 e 2	Frequências
$1 \rightarrow 2$	$(+\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}) \rightarrow (+\frac{1}{2}, -\frac{1}{2})$	$-\nu_2 - \frac{1}{2}J_{12}$
$3 \rightarrow 4$	$(-\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}) \rightarrow (-\frac{1}{2}, -\frac{1}{2})$	$-\nu_2 + \frac{1}{2}J_{12}$
$1 \rightarrow 3$	$(+\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}) \rightarrow (-\frac{1}{2}, +\frac{1}{2})$	$-\nu_1 - \frac{1}{2}J_{12}$
$2 \rightarrow 4$	$(+\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}) \rightarrow (-\frac{1}{2}, -\frac{1}{2})$	$-\nu_1 + \frac{1}{2}J_{12}$

Os níveis de energia e os correspondentes esquemas do espectro são mostrados na Figura 4. Por exemplo, a transição $1 - 2$ envolve ao spin 2 indo de $(+1/2)$ para $(-1/2)$ enquanto o spin 1 permanece no estado $(+1/2)$ (ver a Tabela 3). Nesta transição pode-se dizer que o spin 2 é ativo e o spin 1 passivo, mostrando-se assim, a primeira linha espectral

do duplete para o spin 2 (Figura 4). A transição 3 – 4 é similar à transição 1 – 2, exceto que o spin passivo (spin 1) encontra-se no estado $(-1/2)$ (ver a Tabela 3); esta transição forma a segunda linha no espectro do duplete para o spin 2 (Figura 4).

Para as transições 1–3 e 2–4 o spin 1 se matem ativo, enquanto o spin 2 permanece passivo, dando origem a primeira e segunda linha no espectro do duplete para o spin 1 (Figura 4 e Tabela 3).

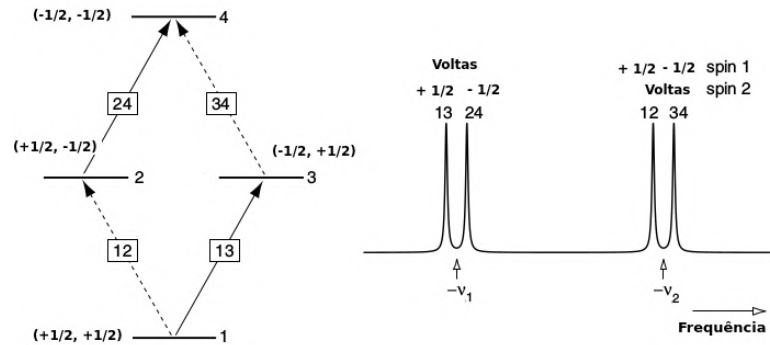


Figura 4: Na esquerda, os níveis de energia do sistema de dois spins. As setas mostram as transições permitidas: linhas sólidas por uma transição na qual o spin 1 se movimenta e as pontilhadas na qual o spin 2 se movimenta. Na direita, podemos ver os correspondentes espectros, assumindo que a frequência de Lamor do spin 2 é maior em magnitude que do spin 1 e que o acoplamento J_{12} é positivo. (Figura extraída e modificada de James Keeler, 2002).

O desenvolvimento do hamiltoniano para o acoplamento escalar de três núcleos $(1/2)$, nas mesmas condições mostradas anteriormente (Homonuclear - $\nu_1 \approx \nu_2 \approx \nu_3$), pode ser visto nas referencias (James Keeler, 2002; Gil e Geralades, 1987).

2.2.3 O Modelo Vetorial

Para a maioria dos tipos de espectroscopia, representações esquemáticas envolvendo níveis de energia e regras de transição para spins, acaba sendo suficiente para descrever sistemas simples de 1 ou 2 spins no máximo. No entanto, para RMN isso não é suficiente. Por exemplo, usando essa abordagem de nível de energia não podemos nem descrever como funciona o experimento de RMN pulsado mais básico. Portanto, para prosseguir na compreensão dos experimentos de RMN, precisamos de mais algumas ferramentas, e a primeira delas que vamos explorar é o modelo vetorial.

2.2.3.1 Magnetização

Numa amostra macroscópica, para $t < 0$, ou seja, antes de o campo de RF ser aplicado, podemos considerar o sistema de spins nucleares inicialmente em equilíbrio térmico, na presença do campo magnético, $\vec{B}_0 = (0, 0, B_0)$, somente. Estatisticamente (ver o Jackson, 1998) podemos calcular o valor médio da densidade volumétrica de magnetização, ou simplesmente o vetor de magnetização efetiva (\vec{M}_0). A diferença entre as populações dos estados ($m = + 1/2$ e $m = - 1/2$) de um sistema de núcleos de spin, $I = 1/2$, que pode ser obtida segundo uma distribuição estatística de Boltzman (Jackson, 1998), determina o vetor de magnetização efetiva, definido como o momento de dipolo magnético total contido em um volume, V , de material, dividido por esse mesmo volume e apontando ao longo da direção do campo aplicado, \vec{B}_0 , ou seja, $\vec{M}_0 = (0, 0, \sum \vec{\mu}_i/V)$.

2.2.3.2 Pulso de radiofrequência

Com o intuito de sondar o sistema através da RMN se faz necessária a aplicação de um campo de RF linealmente polarizado na amostra macroscópica (ver a equação 2.6). No entanto, nesta seção o campo $\vec{B}_1(t)$, será descomposto em dois campos circularmente polarizados girando em sentidos opostos e descritos conforme a equação (2.25),

$$\vec{B}_1(t) = B_1 \cos(\omega_{RF}t + \phi) \hat{i} + B_1 \sin(\omega_{RF}t + \phi) \hat{j}. \quad (2.25)$$

A equação (2.25), mostra o campo de RF com evolução temporal, portanto, para simplificar sua descrição vetorial, devemos torná-lo independente do tempo, passando do sistema de referencia de laboratório (RL) para um sistema referencia rotante (RR). Para esta transformação de coordenadas, o RR passará a girar na frequência de Larmor (ω_0) em torno do eixo, Z_{Lab} , considerando a condição de ressonância, ou seja, que $\omega_{RF} = \omega_0$ (a transformação de um sistema de coordenadas para outro pode ser feito com operador de rotação de coordenadas, $\hat{U}(t)$, ver o Sakurai e Napolitano, 2011).

O campo magnético B_1 pode então ser descrito no RR por:

$$\vec{B}_1 = B_1 \cos(\phi) \hat{i} + B_1 \sin(\phi) \hat{j}. \quad (2.26)$$

Da equação (2.26), podemos ver que a fase, ϕ , toma valores de: $0^0, 90^0, 180^0$ e

270⁰. Logo, as direções dos pulsos do campo magnético, \vec{B}_1 , no RR estão alinhadas nos eixos $X', Y', -X'$ e $-Y'$.

2.2.3.3 Interação do pulso de radiofrequência com o vetor de magnetização

Para $t > 0$, na presença do campo, \vec{B}_0 , e do campo independente do tempo, \vec{B}_1 , a magnetização, \vec{M}_0 , varia com o tempo segundo a expressão (2.27)

$$\frac{d\vec{M}^r(t)}{dt} = \vec{M}^r(t) \times \gamma \cdot \vec{B}_{eff}. \quad (2.27)$$

Portanto, podemos obter a solução da equação (2.27) no referencial rodado, na presença de um campo magnético efetivo, que irá resultar nas equações de Bloch (James Keeler, 2002)

$$\frac{d\vec{M}^r(t)}{dt} = \gamma \begin{vmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ M_x^r & M_y^r & M_z^r \\ B_1 \cos(\phi) & B_1 \sin(\phi) & B_0 \end{vmatrix} \quad (2.28)$$

O pulso de RF (\vec{B}_1) tem uma duração (t_p) tal que no fim de sua aplicação, a magnetização (\vec{M}^r) resulta em uma situação de não-equilíbrio e fazendo um ângulo β com o eixo z:

$$\beta = \omega_1 \cdot t_p \quad (2.29)$$

Um pulso de $\phi = 90^0$ graus com fase Y' , é aquele no qual o tempo (t_p) de aplicação do pulso de RF é suficiente para o vetor, \vec{M}^r , fazer um ângulo de $\beta = 90^0$ em relação ao eixo Z alinhado-se inicialmente na direção do eixo- X se adotarmos como padrão, a regra da mão esquerda (ver a Figura 5).

Pulsos de 90^0 são chamados de pulsos de excitação, pois as populações dos estados, $+1/2$ e $-1/2$, são igualadas tornando nula a magnetização longitudinal e máxima a transversal.

Por outro lado, se deixamos o pulso de RF ligado por mais tempo a magnetização, M^r , poderá fazer um ângulo de 180^0 convertendo-se em $-M_0$. Esta situação corresponde à inversão de população entre os estados $(+1/2)$ e $(-1/2)$. Um pulso que inverte a magnetização é um pulso de 180^0

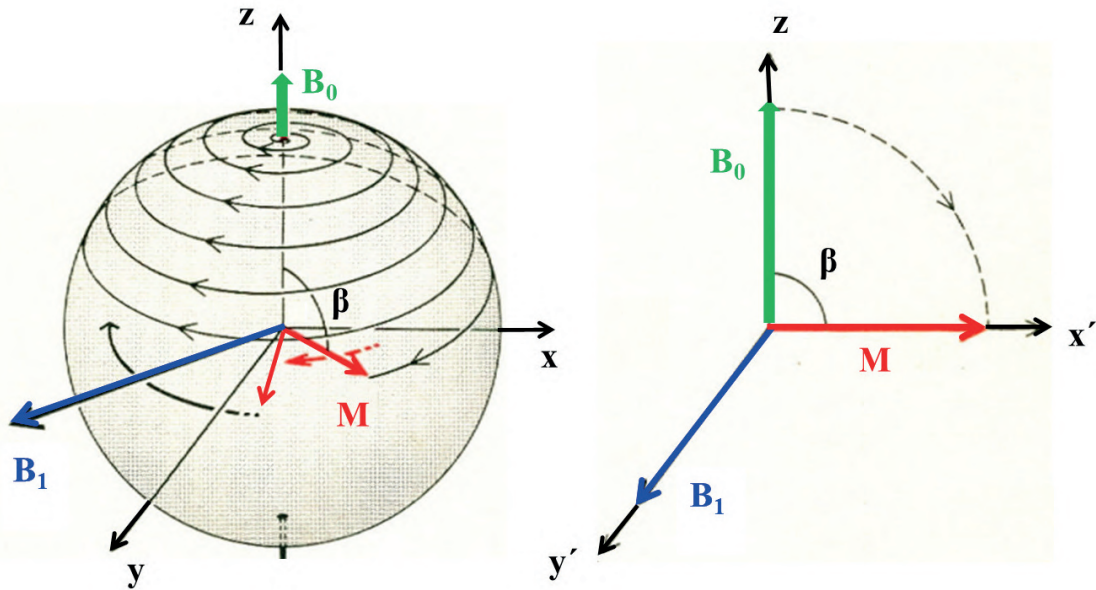


Figura 5: Para $t > 0$, o efeito do pulso de $\phi = 90^\circ$ é suficiente para que o vetor de magnetização, M_0 no equilíbrio seja convertido em magnetização transversal, fazendo um ângulo de, $\alpha = 90^\circ$, em relação ao eixo Z. Esquerda: representação no referencial de laboratório (RL). Direita: representação no sistema rotante (RR). (Figura extraída e modificada de James Keeler, 2002)

2.2.3.4 Sinal de RMN

Após a aplicação do pulso de RF (90°) e, para simplificação dos cálculos considerando desprezíveis as interações magnéticas no sistema de spins, a magnetização transversal (\vec{M}^+) sentirá apenas a presença do campo magnético estático, \vec{B}_0 , e precessionará em torno dele com frequência, ω_0 . No entanto, à medida em que precessa ao redor de, \vec{B}_0 , a magnetização retorna ao estado de equilíbrio térmico. Neste caso, o retorno ao equilíbrio envolve eliminar a magnetização transversal no plano $X'Y'$ (relaxação transversal) e o retorno da magnetização ao longo do campo magnético B_0 (relaxação longitudinal). Dessa forma, a equação de Bloch, que descreve o comportamento da magnetização na presença do campo, \vec{B}_0 , deve incluir o efeito de relaxação das magnetizações transversal e longitudinal. Então escrevemos

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma \cdot \vec{B}_0 - R(\vec{M}(t) - \vec{M}_0). \quad (2.30)$$

em que, R , é a matriz de velocidades de relaxação da magnetização,

$$R = \begin{pmatrix} R_2 & 0 & 0 \\ 0 & R_2 & 0 \\ 0 & 0 & R_1 \end{pmatrix} \quad (2.31)$$

A equação de Bloch pode ser reescrita na forma matricial. Na ausência de um pulso de RF podemos escrever,

$$\begin{pmatrix} \frac{dM_x}{dt} \\ \frac{dM_y}{dt} \\ \frac{dM_z}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\Omega M_y(t) - R_2 M_x(t) \\ \Omega M_x(t) - R_2 M_y(t) \\ -R_1 (M_z(t) - M_0) \end{pmatrix} \quad (2.32)$$

onde, $\Omega = \omega_0 - \omega_{RF}$, é a frequência efetiva (offset).

A solução da equação diferencial para a componente $M_z(t)$ mostra que é da forma exponencial, e que o retorno completo ao equilíbrio exige que componente longitudinal M_z volte ao valor inicial de M_0 (z).

$$M_z(t) = M_0(1 - \exp(-R_1 t)). \quad (2.33)$$

A precessão livre da magnetização transversal ao redor de B_0 induz a formação de uma corrente elétrica nas bobinas de detecção, gerando um sinal chamado de *Free Induction Decay (FID)*. O FID detectado corresponde aos componentes, M_x e M_y que decaem devido à relaxação da magnetização transversal com taxa R_2 , como mostrado nas equações (2.34 e 2.35)

$$M_x(t) = \frac{1}{2} M_0 \cos(\Omega t) \exp(-R_2 t), \quad (2.34)$$

$$M_y(t) = \frac{1}{2} M_0 \sin(\Omega t) \exp(-R_2 t). \quad (2.35)$$

As duas componentes, correspondentes a M_x e M_y , são combinadas para formar um sinal complexo. Deste modo, o sinal de RMN decai exponencialmente segundo a equação (2.36) (ver a Figura 4) :

$$S(t) = S_x(t) + iS_y(t) = \frac{1}{2} M_0 \exp(i\Omega t) \exp(-R_2 t). \quad (2.36)$$

2.2.4 Transformada de Fourier e processamento de dados

A frequência de cada sinal no espectro de RMN pode ser obtida a partir da transformada de Fourier do sinal *FID* detectado em função do tempo, dada por

$$S(\omega) = \int_0^{\infty} S(t) \exp(-i\omega t) dt, \quad (2.37)$$

de onde vem

$$S(\omega) = M_0 \int_0^{\infty} \exp[i(\Omega - \omega) - R_2] t dt. \quad (2.38)$$

A solução dessa integral (ver Howard, 2014) é da forma

$$S(\omega) = \frac{M_0}{i(\omega - \Omega) + R_2} = \frac{iM_0(\Omega - \omega) + R_2M_0}{(\Omega - \omega)^2 + R_2^2}. \quad (2.39)$$

A expressão acima pode ser separada em uma parte real, $A(\omega)$, e outra imaginária, $D(\omega)$, tal que

$$S(\omega) = A(\omega) + iD(\omega), \quad (2.40)$$

com

$$A(\omega) = M_0 \frac{R_2}{(\Omega - \omega)^2 + R_2^2}, \quad (2.41)$$

$$D(\omega) = M_0 \frac{(\Omega - \omega)}{(\Omega - \omega)^2 + R_2^2}. \quad (2.42)$$

A parte real possui a forma de uma Lorentziana, enquanto que a parte imaginária possui forma dispersiva. O espectro de RMN corresponde apenas à parte real; a parte imaginária geralmente é descartada. A equação(2.41), que descreve a parte absorptiva do espectro, é caracterizada por um pico quando $\Omega = \omega$, como mostrado na Figura 6.

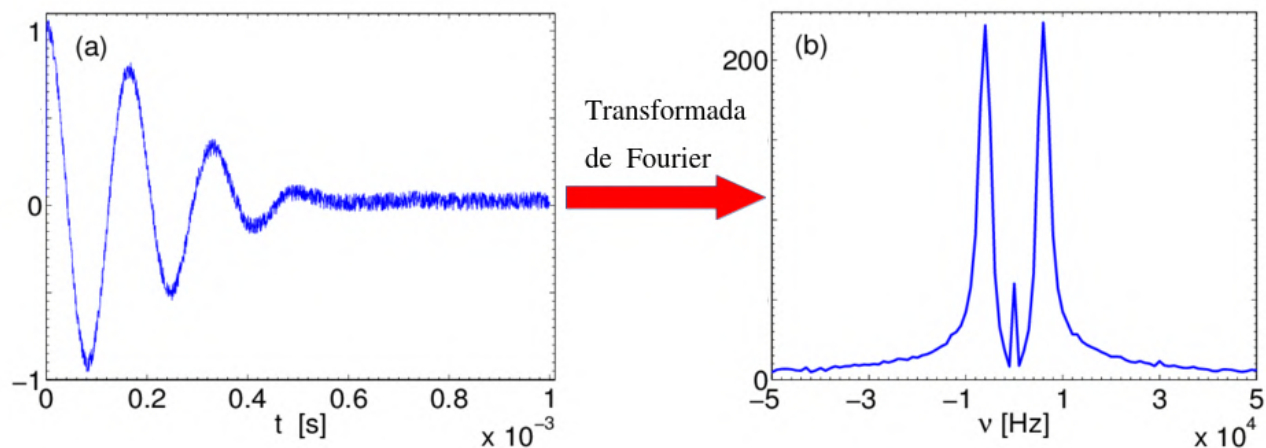


Figura 6: (a) Sinal de decaimento exponencial (FID). (b): Espectros de RMN, encontrados através da transformada de Fourier (Figura extraída é modificada de Bonin, 2011).

2.3 Análise multivariada (PLS-DA)

A aquisição de dados via detecção espectroscópica (RMN, massa ou outros) representa um duro desafio para os investigadores, que enfrentam dois problemas cruciais: a dimensionalidade dos dados maior que o número de observações, e o alto nível de correlação entre as variáveis. Nesta tese de doutorado, foi proposta a utilização da técnica estatística, análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis – PLS-DA), como um método para a classificação de dados hiperespectrais (Barker e Rayens, 2003; Gottfries et.al., 1995). Isto pelo fato de que o, PLS-DA, pode providenciar uma análise exploratória de dados. Fordellone e colaboradores (Fordellone et al., 2018) mostraram que de fato o PLS-DA, identifica classes que são mais homogêneas e de melhor separação em comparação com outros métodos de classificação comumente usados, tais como classificadores não paramétricos (KNN e SVM) e outras funções de discriminação (LDA). Por exemplo, em metabolômica, via a visualização de variáveis significantes tais como os metabolitos ou picos espectroscópicos (Brereton e Lloyd, 2014; Mevik e Wehrens, 2007).

PLS-DA é um método de classificação supervisionado que usa a técnica de regressão multivariada para extrair via combinação linear de variáveis originais, \mathbf{X} , a informações que pode prever a classe, \mathbf{Y} . O PLS-DA é derivado de (Partial least squares regression - PLSR) e envolve a formação do modelo de regressão entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} como mostrado na equação (2.43).

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{B} + \mathbf{F}, \quad (2.43)$$

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1j} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2j} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nj} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_j \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \\ \vdots \\ f_j \end{pmatrix} \quad (2.44)$$

onde, \mathbf{Y} é o vetor de função resposta de $n \times 1$, \mathbf{X} é a matriz de dados de $n \times J$, \mathbf{B} é a matriz de coeficiente de regressão de $J \times 1$, e \mathbf{F} é o vetor de erro de $J \times 1$. Neste caso, a solução de mínimo quadrado é dado por $\mathbf{B} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y}$.

Em muitos casos, existe o problema da singularidade da matriz, $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})$. PLS-DA, resolve este problema decompondo a matriz de dados, \mathbf{X} , na matriz de scores ortogonais \mathbf{T} ($n \times P$) e a matriz de carga \mathbf{P} ($J \times P$), e o vetor de função resposta, \mathbf{Y} , em scores ortogonais \mathbf{T} ($n \times P$) e a matriz de carga \mathbf{Q} ($1 \times P$). Portanto, existem duas equações fundamentais no modelo de PLS-DA:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}\mathbf{Y} = \mathbf{T}\mathbf{Q}^T + \mathbf{F}. \quad (2.45)$$

Agora, definiremos a matriz de pesos (weights) \mathbf{W} ($J \times P$), definindo a matriz de scores, \mathbf{T} , como

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{W}(\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \quad (2.46)$$

Substituindo (2.46) em (2.45) e o resultado em (2.43), obtemos que o vetor de função resposta, \mathbf{Y} , pode ser escrito segundo a equação (2.47)

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{W}(\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{Q}^T + \mathbf{F}, \quad (2.47)$$

onde o vetor de coeficiente de regressão \mathbf{B} é dado por

$$\mathbf{B} = \mathbf{W}(\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{Q}^T. \quad (2.48)$$

Desta forma, qualquer valor desconhecido da classe (ou grupo) \mathbf{Y} pode ser predito por $\vec{\mathbf{Y}} = \mathbf{X}\vec{\mathbf{B}}$, sendo que os valores de $\vec{\mathbf{B}}$ são agrupados na matriz diagonal \mathbf{B} .

O algoritmo PLS-DA mostrado em (Brereton, et al., 2014 e Fordellone, et al., 2018) pode estimar as matrizes \mathbf{W} , \mathbf{T} , \mathbf{P} e \mathbf{Q} . Softwares como SIMCA-P (Bloise et al. 2020) e Metabo Analyst (Xia and Wishart, 2016) também usam o algoritmo PLS-DA, e da mesma forma que o PCA, os resultados PLS-DA podem ser observados em planos bidimensionais chamados *scores e loadings plots*, os quais são formados através de componentes principais (PCs: PC1, PC2, ... PCn) (Carrola et al., 2020). Adicionalmente, o *loading plot* pode ser colorido como uma variável de função de importância para a projecção, *VIP*, para destacar e identificar os metabólitos responsáveis pelas tendências de discriminação (com $VIP > 1$) (Bloise et al. 2020).

Também, por PLS-DA, através da cross-validação pode-se estimar os parâmetros, R^2 e Q^2 , os quais parametrizam, respectivamente, sua previsibilidade e sua preditibilidade. Podemos interpretá-los da seguinte forma: quanto mais próximos, R^2 e Q^2 , são de 1 mais robusto é o modelo (Xia and Wishart 2016).

2.4 Análise univariada

Apesar da capacidade do método multivariado (PLS-DA) de identificar tendências de agrupamento, as variáveis (moléculas ou simplesmente metabólitos) classificadoras de grupo, indicadas pelos coeficientes VIP, tem que ser testados de acordo com sua respectiva significância estatística, através da obtenção do (*p*-valor) com métodos univariados paramétricos como t de Student, ANOVA ou análogos não-paramétrico como Wilcoxon ou Kruskal-Wallis (Xia and Wishart, 2016).

O *p*-valor pode fornecer a significância estatística da diferença entre duas variáveis comparadas. Quando $p < 0.05$, significa que existe diferença entre as variáveis comparadas. O *p*-valor também pode expressar a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando $p > 0.05$, mostrando que não existe diferença entre duas variáveis comparadas em um nível de significância pré-estabelecido. Apesar disso, os *p*-valores são muito influenciados pelo tamanho da amostra (Kalinowski and Fidler, 2010), decrescendo com o aumento do número de amostras em comparação.

2.5 Breve visão geral das principais vias metabólicas celulares

O metabolismo celular pode ser visto como uma complexa rede de reações químicas acontecendo simultaneamente, as quais são catalisadas por enzimas e estritamente reguladas. Isto permite aos organismos crescer e reproduzir-se, mantendo suas estruturas, e respondendo a mudanças ambientais (Nelson and Cox, 2004). Como mostrado na Figura 7, essas reações são organizadas dentro de muitas vias metabólicas interdependentes (Kanehisa et al., 2016). Algumas dessas vias serão brevemente descritas a seguir, devido não apenas a grande importância em células animais, mas também por sua relevância no contexto dos resultados apresentados nesta tese.

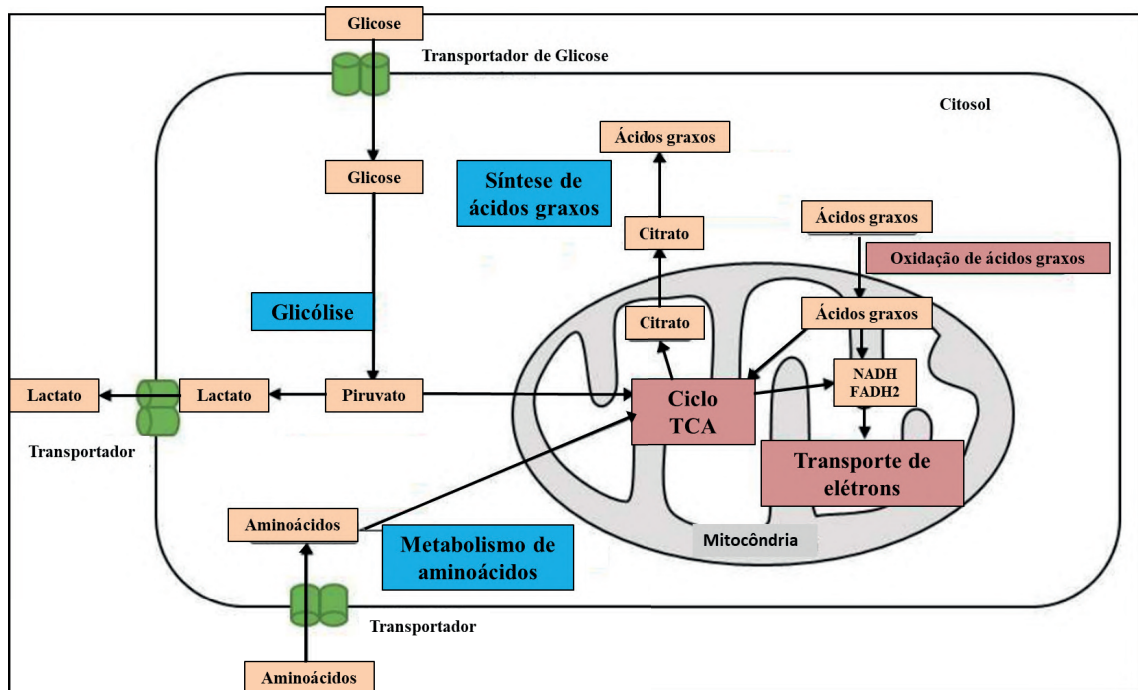


Figura 7: Figura ilustrando a integração das principais vias metabólicas em células animais. Piruvato da glicólise, é convertido em lactato e liberado fora da célula, ou usado como substrato energético para o ciclo TCA. O ciclo TCA também pode ser ativado por aminoácidos que originam acetyl-CoA, piruvato ou ciclos intermediários, ou por acetyl-CoA resultante da oxidação do ácido graxo. O Citrato gerado no ciclo TCA é usado para síntese de ácidos graxos. As caixas vermelhas, são vias que dependem do oxigênio; no entanto, caixas azuis, são vias independentes de oxigênio. Figura extraída e modificada (Carrola et al., 2020)

2.5.1 Glicólise

A glicólise é um processo de dez etapas pelo qual as células dividem uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, produzindo também duas moléculas de ATP (adenina

trifosfato) e duas de NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) (Figura 8 esquerda). Esta começa com a absorção extracelular da glicose e prossegue dentro do citosol da célula. Na fase inicial, a molécula de glicose de seis carbonos é fosforilada a glicose-6-fosfato, que é convertida em frutose-6-fosfato; então, outra fosforilação ocorre, formando frutose-1,6 bifosfato, que é dividida em duas moléculas de três carbonos, gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (mais tarde isomerizado a gliceraldeído-3-fosfato). Nessas etapas, duas moléculas de ATP são consumidas. Então, cada molécula de gliceraldeído-3-fosfato é oxidada e fosforilada por um fosfato inorgânico (P_i) para formar 1,3-bisfosfoglicerato. Esta reação é acompanhada pela redução de NAD^+ para NADH. As duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato são então desfosforiladas em sucessivas etapas, com a formação de quatro moléculas de ATP, produzindo duas moléculas de piruvato. O piruvato pode subsequentemente ser oxidado para produzir o grupo acetil da acetil-coenzima (Acetil-CoA), que entra ao ciclo ácido tricarboxílico (TCA), como parte da respiração aeróbica (seção 2.5.2).

A via glicolítica está sob o controle enzimático da fosfofrutoquinase (PFK-1) atuando como a principal chave regulatória e ponto de taxa limitante da glicólise (Berg et al., 2002). PFK-1 é inibida por ATP e ativada por AMP, fazendo assim a atividade glicolítica dependente do status energético celular. PFK-1 é também regulada por metabólitos que sinalizam a viabilidade de construir blocos para a biossíntese, sendo inibida por citrato (gerado no ciclo TCA) e ácidos graxos de cadeia longa. Por outro lado, a frutose-2,6 bifosfato é a mais potente ativadora alostérica do PFK-1, sendo capaz de elevar a atividade enzimática sempre quando os níveis de ATP são altos.

Embora a glicólise não seja altamente eficiente em termo de energia (rendimento de duas moléculas de ATP por cada molécula de glicose oxidada), esta assume papel fundamental ao gerar moléculas de NADH, usadas como transporte de elétrons em múltiplas reações bioquímicas. Em consequência, células que proliferam rapidamente (como células tumorais) são frequentemente caracterizadas por uma intensa atividade glicolítica (Mazurek, 2007). Para manter o fluxo glicólico, as células deverão regenerar NAD^+ em NADH. Esse processo realizado nas mitocôndrias através do transporte da cadeia de elétrons, ou, quando os níveis de oxigênio são reduzidos, através da conversão de piruvato em lactato, catalisado por a enzima lactato desidrogenase (LDH)- fermentação láctica (Ver Figura 9, cor púrpura).

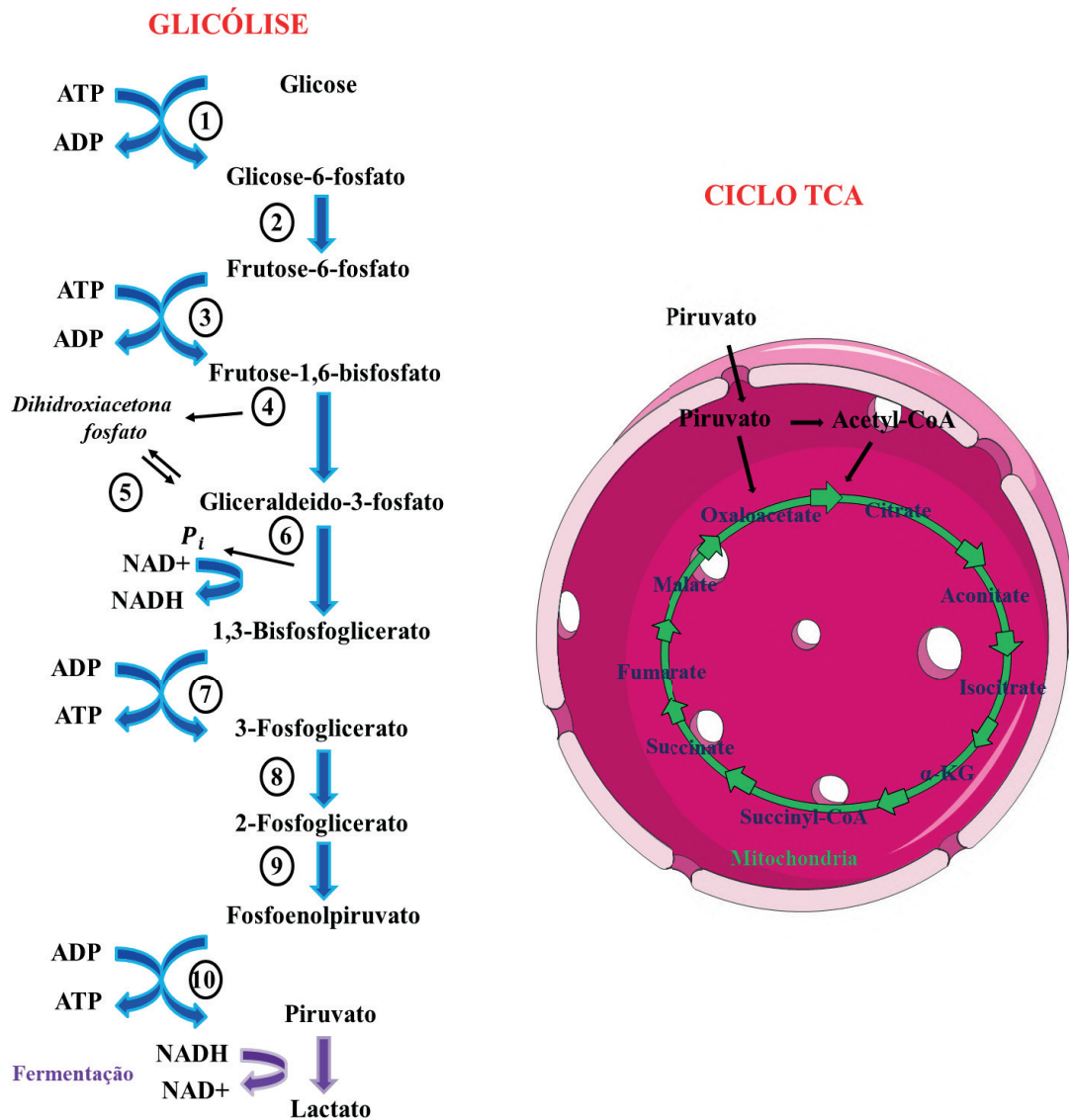


Figura 8: Representação esquemática de vias metabólicas. Figura da esquerda a via glicolítica (azul) e a fermentação de ácido láctico (púrpura). Os números descrevem os processos de etapas. Figura direita reação do ciclo TCA.

2.5.2 O ciclo TCA

O ciclo TCA é uma série de oito reações catalisadas enzimaticamente que ocorre na mitocôndria e considerada como parte fundamental da respiração aeróbica celular (Figura 8 direita). Acetil-CoA, derivado do piruvato na glicólise, da oxidação de ácidos graxos, ou do metabolismo de aminoácidos, entra no ciclo TCA pela doação de seu grupo acetil de quatro carbonos para o oxaloacetato, formando o citrato de seis carbonos, numa reação de condensação. Em seguida, em passos reversíveis, o citrato é desidratado produzindo cis-aconitase, o qual é hidratado para formar isocitrato. A descarboxilação oxidativa do

isocitrato, requer do NAD(P)^+ um elétron aceitador, para assim formar α -ketoglutarato, NAD(P)H e CO_2 . A seguir, outra descarboxilação é dada, onde α -ketoglutarato é convertido para succinil-CoA e CO_2 . Nessa etapa, NAD^+ também atua como aceitador de elétrons. Então, o succinato é reversivelmente formado através da hidrólise do vínculo tioéster em succinil-CoA. Esta reação tem passos intermediários onde a enzima é fosforilada, e então o grupo fosforil é transferido para ADP/GDP para formar ATP/GTP. Succinato é então reversivelmente oxidado para fumarato, e FADH_2 é formado de FAD. Seguindo a hidratação reversível do fumarato para malato, o último é finalmente oxidado para oxaloacetate, com a produção de NADH, em um passo reversível.

NADH e FADH_2 são dois produtos principais do ciclo TCA, que transferem elétrons ao oxigênio molecular (reduzindo para água) em um conjunto de proteínas de membranas conhecido como a cadeia de transporte de elétrons. Isto leva à formação de um gradiente de prótons através do interior da membrana mitocondrial, que provoca a síntese de ATP. Resumindo, este processo de fosforilação oxidativa gera 26 das 30 moléculas de ATP formadas quando uma molécula de glucose é completamente oxidada para CO_2 e água (Berg et al., 2002).

O ciclo TCA também desempenha uma função importante no anabolismo, já que este providência intermediários na biossíntese envolvida tais como succinil-CoA para a formação de porfirinas, α -ketoglutarato ou oxaloacetato para síntese de aminoácidos, e citrato para a formação de ácidos graxos. Este papel anabólico é geralmente sustentado pela reposição de intermediários do ciclo TCA pela anaplerose, principalmente usando aminoácidos como substratos, a fim de manter o ciclo em funcionamento.

2.6 Câmara de Neubauer e MTT

Existem duas maneiras de quantificar células em cultura. Na forma direta, conta-se com a ajuda de um microscópio invertido o número de células que estavam presentes na garrafa de cultivo; a forma indireta é feita por meio da quantificação de determinadas estruturas celulares ou pela medição do metabolismo celular.

Como forma de quantificação direta, o método mais comum é a contagem por câmara de Neubauer (Fiocruz, et al., 2017). Já para o método indireto existem muitas técnicas, no entanto, nesta tese de doutorado utilizamos o método de brometo 3- [4,5-dimetil-tiazol- 2-il] - 2,5 – difenil-tetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983).

Para a contagem em câmara de Neubauer, as células devem estar totalmente individualizadas. Para células aderentes, é necessário fazer uma tripsinização prévia, o que não é feito no caso de células não aderentes. A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem, possuindo 9 quadrados que medem 1mm^2 de área, como mostrado na Figura 9. Somente os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células animais. Cada quadrado externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a contagem.

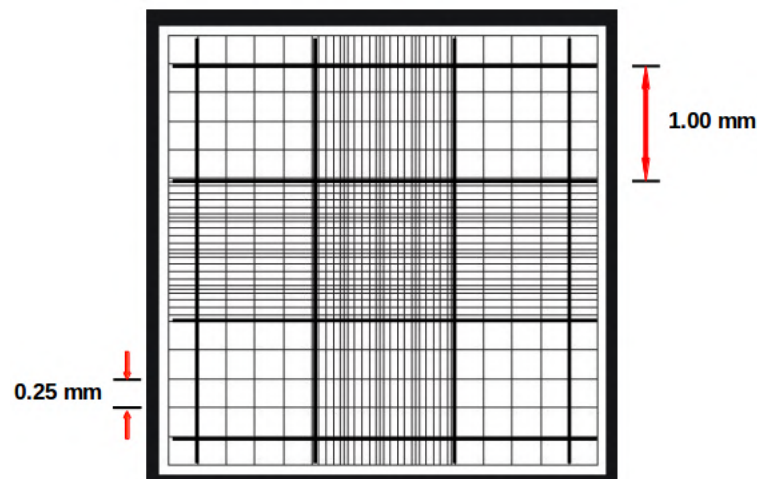


Figura 9: Esquema da câmara Neubauer.

Para a contagem, é necessário colocar uma lamínula de vidro sobre a câmara, que servirá para conter a suspensão celular. O espaço formado entre a lamínula e a câmara é de $0,1\text{mm}$. Dessa forma, o volume determinado por cada quadrado é equivalente a $0,1\text{mm}^3$. A concentração média de células obtidas, (cells/ml), equivale ao número de células contadas nos 4 quadrantes dividido por 4 e multiplicado por 10^4 (fator de correção da câmara).

A equação abaixo, (2.49), resume o cálculo da concentração celular,

$$N^0 \left(\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \left(\frac{q_1 + q_2 + q_3 + q_4}{4} \right) \cdot K \quad (2.49)$$

onde q_i é o valor de contagem de células em um quadrante, e K é o fator de correção.

Para a análise de viabilidade celular utiliza-se o corante azul de *Trypan*, que não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas

danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul, permitindo assim obter a contagem daquelas que morreram.

O ensaio colorimétrico do MTT, tem sido largamente utilizado para mensurar a viabilidade celular (Mosmann, 1983), medir a sensibilidade de novos medicamentos (Oerlemans, et al., 2008) e na combinação de drogas em linhas celulares (Salomons, et al., 1999).

Este ensaio envolve a capacidade de células viáveis converterem metabolicamente o sal de cor amarela de tetrazolium, brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) num precipitado insolúvel em água de cor púrpura, chamado formazan. Isto se dá pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presentes na membrana interna das mitocôndrias intactas das células viáveis (ver a Figura 10) (Wang, et al., 2010; Knetsch, 2013).

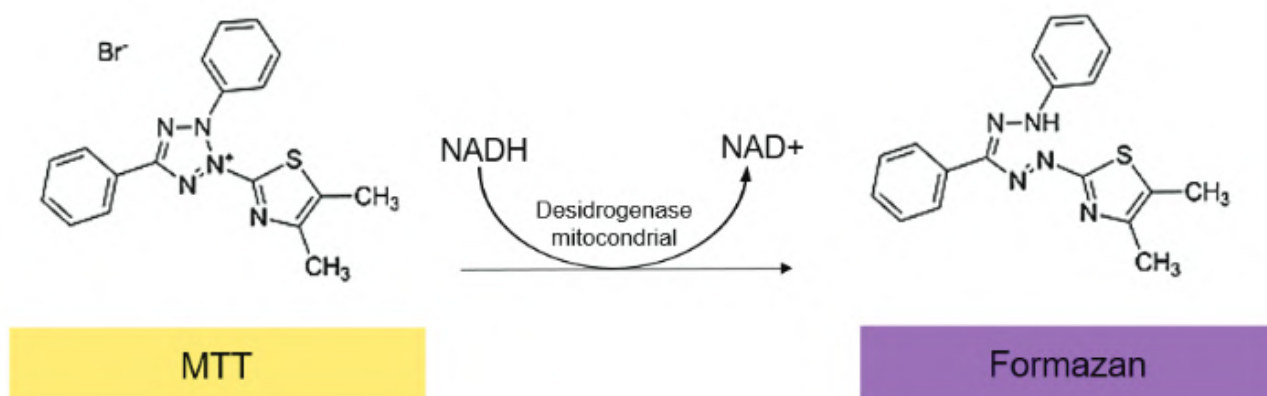


Figura 10: *Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela) a formazan (sal de coloração púrpura). Figura extraída de (Washington, 2018.)*

Os cristais de cor púrpura de formazan formados são posteriormente dissolvidos por solventes orgânicos, como o Dimetilsulfóxido (DMSO), e a densidade óptica resultante da solução formada é quantificada por espectrofotometria UV/visível detectada a $\approx 300nm$ (Ishiyama, et al., 1996).

A viabilidade celular é proporcional à quantidade de sal reduzido e consequentemente quanto maior for a absorvância espectrofotométrica maior o número de cristais de formazan formados pela atividade mitocondrial e portanto maior o número de células viáveis na cultura celular.

2.7 Espalhamento de luz dinâmico

A técnica de espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) está baseada no movimento browniano e no espalhamento de luz por partículas, permitindo assim a avaliação das dimensões de partículas em suspensão, com aplicações tanto na pesquisa como na indústria (Pecora, 2000).

2.7.1 Movimento Browniano

O movimento browniano de uma partícula em suspensão resulta no fato dela estar continuamente sendo bombardeada pelas moléculas do meio solvente, as quais estão em constante agitação térmica (Mörters et al, 2008). O modelo probabilístico mais simples, que permite explicar o movimento browniano das partículas em termos das leis macroscópicas de difusão é o modelo do passeio aleatório (Pearson, 1905). Com este modelo, o deslocamento através do espaço e tempo da partícula em difusão pode ser estudado a partir de um experimento de *distribuição binomial*. As referências da literatura (Roque, 2016; Donsker, 1952) demonstram que a *distribuição binomial* pode convergir para uma *distribuição normal gaussiana*. Com isso, temos como resultado uma *função de probabilidade gaussiana* do deslocamento da partícula que relaciona os parâmetros de posição (Δr), tempo (τ) e difusão (D):

$$p(\Delta r, \tau) = \left(\frac{1}{4\pi D \tau}\right)^{3/2} \cdot e^{-\Delta r^2/4D \tau} \quad (2.50)$$

A expressão para o parâmetro de difusão, D , da equação 2.50, para partículas esféricas de diâmetro, d_Z , em movimento browniano, pode ser encontrada a partir da equação de Stokes-Einstein (Kubo, 1966; Carter, 2001),

$$D = \frac{K_B T}{3\pi\eta d_Z} \quad (2.51)$$

sendo K_B a constante de Boltzmann, T , a temperatura e η a viscosidade do meio.

2.7.2 Espalhamento de Luz

A técnica de DLS consiste na iluminação com um feixe de luz visível incidente de comprimento de onda, λ_0 , e vetor de onda, \vec{k}_0 , sobre uma amostra composta por

partículas espalhadoras em movimento Browniano, que irão espalhar o feixe de luz (campo elétrico) com vetor de onda, \vec{k}_S , em um determinado ângulo, θ , Figura 11.

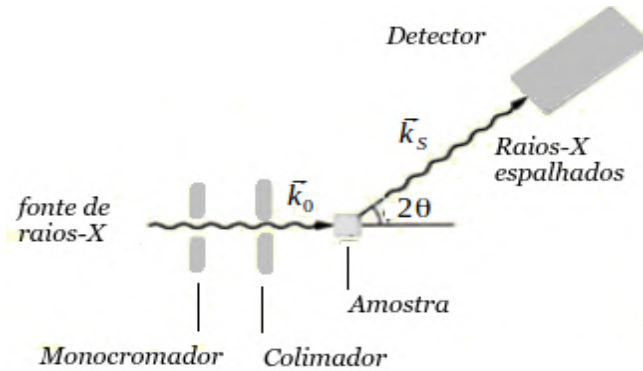


Figura 11: *esquema ilustrativo da técnica de DLS.*

Em 1964, Pecora mostrou (Pecora, 1964) que o constante deslocamento das partículas através do tempo, geraria mudanças no campo elétrico espalhado. Com isso, a intensidade da luz sofre variações no tempo. A correlação da variação na intensidade de luz espalhada proporciona informações sobre o coeficiente de difusão, D , e do tamanho da partícula, utilizando a relação de Stokes-Einstein (equação 2.51).

Essa análise é feita com um correlator, que calcula a função de *autocorrelação da intensidade de luz espalhada normalizada*, $g^{(2)}(\tau)$, e a relaciona com a função de autocorrelação normalizada do campo elétrico, $g^{(1)}(\tau)$, a partir da relação de Siegert, em sistemas diluídos,

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \gamma |g^{(1)}(\tau)|^2 \quad (2.52)$$

onde γ depende de condições instrumentais.

- *Para partículas monodispersas não interagentes*, a integral da função de autocorrelação de campo elétrico, $G^{(1)}(\tau)$, toma a forma da equação (2.53) (para maiores detalhes do cálculo da integral, revisar minha dissertação de mestrado, Vivas, 2018).

$$G^{(1)}(\tau) = \int p(\Delta\vec{r}, \tau) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{\Delta}r(\tau)} d\Delta\vec{r}(\tau) = \langle I \rangle \cdot e^{-Dq^2\tau}, \quad (2.53)$$

e a função de autocorrelação de campo elétrico normalizada, $g^{(1)}(\tau)$,

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-Dq^2\tau}. \quad (2.54)$$

Substituindo a equação (2.54) na equação (2.52) podemos ver que a função de autocorrelação de intensidades normalizada, $g^{(2)}(\tau)$,

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \gamma e^{-2Dq^2\tau} \quad (2.55)$$

decai exponencialmente com uma taxa, $\Gamma = Dq^2$.

Deste modo, foi obtida a taxa de relaxação média, que, por sua vez, pode ser relacionada ao coeficiente de difusão, D e ao vetor de espalhamento q . Uma vez obtido o coeficiente de difusão dos centros espalhadores, livre de interações com relação aos demais centros, é possível determinar o diâmetro, d_Z , assumidas esferas, de acordo com a equação de Stokes-Einstein (equação 2.51).

2.8 Potencial-zeta

A técnica do potencial – zeta (ζ) tem sido amplamente utilizada como um bom indicador da presença de carga superficial, permitindo fornecer informações como a estabilidade de suspensões coloidais (Lytle et al., 1999). Nos experimentos, o potencial-zeta é obtido a partir da mobilidade eletroforética, μ , (Wilson et al., 2000) (Kirby, 2010), conceito que se resume a seguir para orientar o leitor para as aplicações práticas do nosso trabalho.

2.8.1 Medição da mobilidade eletroforética

O espalhamento de luz eletroforético é uma técnica utilizada para medir a mobilidade eletroforética das partículas em dispersão. Nos experimentos o equipamento é capaz de medir a mobilidade, μ , das partículas que se movimentam em um campo elétrico a partir da mudança de frequência da luz espalhada (Shimko et al, 2014).

A mudança de frequência da luz espalhada, $\Delta\nu$, é relacionada com o módulo da velocidade de deslocamento que as partículas adquirem, \vec{v}_d , como mostrado na equação (2.56).

$$v_d = \frac{2\pi\Delta\nu}{q \cos(\theta/2)}. \quad (2.56)$$

O módulo da velocidade que as partículas adquirem, v_d , se relaciona com o módulo do campo elétrico aplicado, E , através da mobilidade eletroforética, μ , segundo a expressão:

$$\mu = \frac{v_d}{E} \quad (2.57)$$

Para medir a mobilidade eletroforética em nosso experimento, foi utilizada a técnica de *Electroforesis Laser Doppler*, baseada no princípio básico do efeito Doppler (Houdas, 1991), que supõe a variação da frequência de qualquer tipo de onda emitida ou recebida por uma partícula em movimento. Por tanto, a equação (2.57) servirá a fim de orientar o leitor de como poderia ser calculado o valor da mobilidade (Ware e Flygare, 1971). Para um maior detalhe do calculo revisar minha dissertação de mestrado (Vivas, 2018).

2.8.2 Mobilidade eletroforética relacionada ao potencial-zeta

Na fronteira entre a camada móvel e a camada imóvel, encontra-se a camada de cisalhamento, onde o potencial zeta, (ζ), pode ser determinado e uma densidade de carga pode ser inferida. (Hotza, 1997; Adamsom, 1982) (ver a Figura 12).

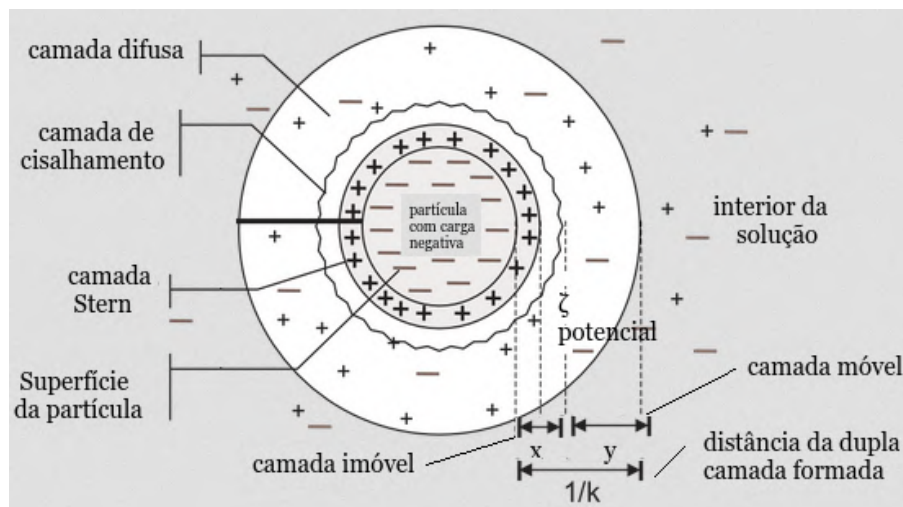


Figura 12: *Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada (adaptado de Jafellicci e Laudemir , 1999).*

O potencial zeta (ζ) está relacionado com a mobilidade eletroforética, μ , e pode ser obtida de distintas formas, em função do tamanho da partícula. Os três modelos mais utilizados para relacionar o potencial zeta e mobilidade eletroforética são: aproximação de Smoluchowski, aproximação de Hückel e a equação de Henry. No entanto, nesta tese só estamos interessados no primeiro modelo.

Aproximação de Smoluchowski (Hiemenz, 1986): é a primeira aproximação que

se faz para calcular o potencial zeta a partir de medidas experimentais de mobilidade. Nesta aproximação, consideramos que as partículas coloidais são esféricas e que seu raio, a , é muito maior que a espessura da dupla camada formada, $1/k$, tal como representada Figura 13.

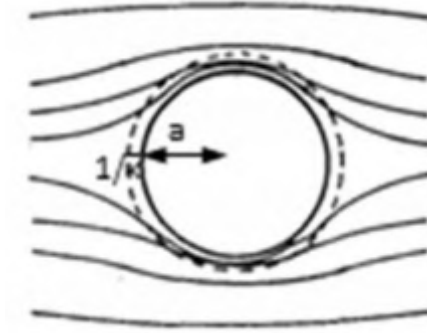


Figura 13: *Distorção do campo elétrico aplicado sobre uma partícula esférica de raio a . As linhas tracejadas representam a espessura da camada dupla, $1/k$. (Hiemenz, 1986)*

Sob estas condições, o campo elétrico aplicado afeta o movimento da partícula, já que esta experimenta um campo distorcido, e o potencial zeta na camada de cisalhamento é encontrado segundo a expressão (para maiores detalhes da obtenção do potencial, revisar o autor Hiemenz, 1986):

$$\zeta = \frac{\eta \cdot v_d}{\epsilon \cdot E} \quad (2.58)$$

onde, v_d , é a velocidade relativa entre a partícula e o meio circundante, ϵ , a constante dielétrica e, η , a viscosidade do solvente. Em termos de mobilidade eletroforética, podemos rearranjar a equação (2.58) para obter a equação de Smoluchowski :

$$\mu = \frac{v_d}{E} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (2.59)$$

Existe, portanto uma expressão para descrever a relação entre a mobilidade de uma partícula (um valor experimental) e o potencial zeta.

2.9 Espectroscopia de absorção UV-vis

A incidência de radiação electromagnética na matéria pode resultar em dois processos de interação: (1) ela pode ser espalhada e sua direção de propagação é modificada,

ou (2) ela pode ser absorvida, transferindo energia para a matéria.

No processo de absorção da radiação, a energia a ser absorvida pela matéria está relacionada com a frequência, ν , desta radiação, através da relação da equação 2.60,

$$E = h\nu_a \quad (2.60)$$

onde, h , é a constante de Planck. A equação (2.60), postulada por A. Einstein (Eisberg e Resnick, 1979) implica, o caráter corpuscular da luz e a quantização dos níveis de energia do átomo ou molécula, existindo assim valores permitidos, ou quantizados, de energia.

Nesta tese, não iremos deduzir os níveis de energia permitidos, mas podemos recorrer a um modelo simplificado de uma molécula diatômica para uma melhor compreensão do ponto de vista qualitativo.

A Figura 14 mostra uma molécula diatômica, A-B, onde, para um dado estado, a energia potencial dependerá da distância entre os núcleos. A abscissa representa a separação entre os dois átomos, com o átomo, A, colocado na origem. A ordenada representa a energia potencial.

Desta forma, no seu estado de menor energia, a molécula, A - B, é representada pelos pontos colocados como, A e B, na abscissa, onde o átomo, A, é estático e o átomo, B, pode estar oscilando dentro da curva de potencial (cor preta). As linhas horizontais dentro da curva indicam diferentes níveis de energia vibracional permitidos, e entre estes últimos, encontramos ainda, os níveis de energia rotacionais.

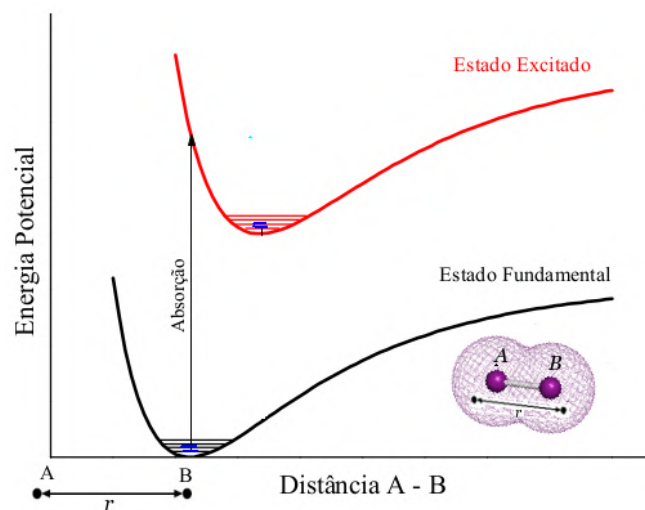


Figura 14: *Níveis de energia de uma molécula diatômica, A-B, simples. Figura baseada no texto Takara, 2006.*

Uma molécula excitada, é uma molécula, na qual, um elétron foi levado para um nível de maior energia. Tal molécula tem a sua própria curva de energia potencial característica (curva vermelha, Figura 14). Por exemplo, a absorção de energia na faixa das micro-ondas levará a transições que envolvem os níveis rotacionais, enquanto a faixa do infravermelho promoverá transições entre estados vibracionais. Já a absorção na faixa do ultravioleta até o visível, abrangerá transições eletrônicas e constituem o estudo da técnica espectroscópica de absorção óptica.

De acordo como a mecânica quântica, uma transição eletrônica ocorre quando um elétron sai de um orbital do estado fundamental de energia, $E_1(r)$, e vai para um orbital desocupado de maior energia, $E_2(r)$, através da absorção de um fóton com energia, $h\nu_a$. Em sistemas moleculares, os orbitais no estado fundamental de energia são chamados HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e podem ser classificados como, σ e π . Enquanto, no estado excitado, os orbitais são chamados LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) e são classificados como, σ^* e π^* . Por exemplo, a absorção de um fóton de energia, $h\nu_a$, poderá levar um elétron do orbital, π , para um orbital desocupado, π^* , e essa transição será chamada de, $\pi \rightarrow \pi^*$, veja a equação 2.61 (Vequi-Suplyci, 2010).

$$\nu_a = \frac{E_{\pi^*}(r) - E_{\pi}(r)}{h} \quad (2.61)$$

A transição eletrônica acontece em tempo muito curto, 10^{-15} segundos, durante o qual as posições nucleares não se alteram enquanto os elétrons assumem configurações do estado excitado. Por esse motivo na Figura 14, essa transição é representada por uma linha vertical. Esse princípio é conhecido como princípio de Frank-Condon (Frank, 1926; Condon, 1928).

2.9.1 Lei de Lambert-Beer

Experimentalmente, a luz absorvida por uma molécula pode ser analisada através de medidas de absorbância em função do comprimento de onda da luz incidente. Lambert observou empiricamente, que é possível relacionar a absorbância com a concentração da amostra e o caminho percorrido pela luz dentro da mesma. A partir das observações fenomenológicas de Lambert e Beer (Beer, 1852), foi possível deduzir uma equação denominada Lei de Lambert-Beer.

Considere um feixe de luz que transporta energia com comprimento de onda, λ , e tem intensidade I^0 , conforme indicado na Figura 15. O feixe incide em uma amostra contida em um recipiente de caminho óptico, d . O diferencial de intensidade, dI , ao longo do caminho percorrido pela luz, pode ser escrito como,

$$dI(y) = -\epsilon CI(y)dy \quad (2.62)$$

onde, ϵ , é uma constante de proporcionalidade chamada coeficiente de absorção molar, que depende apenas da molécula absorvedora e, C , refere-se à concentração dessas moléculas na amostra.

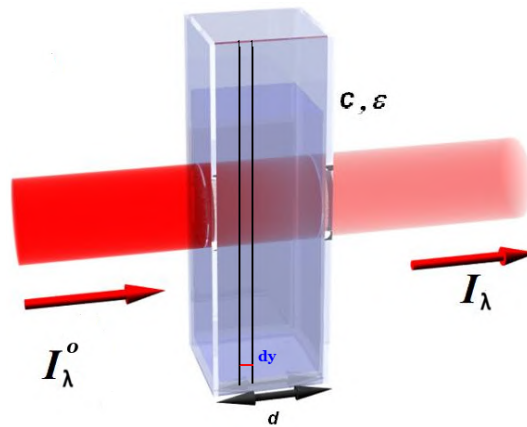


Figura 15: Ilustração da atenuação da luz incidente no recipiente de caminho óptico d .

Integrando a equação (2.62) para toda a extensão da amostra, o membro da esquerda de, I_λ , até, I_λ^0 , visto que, $I_\lambda \leq I_\lambda^0$, da direita de, 0 a d , encontramos,

$$\ln\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) = \epsilon Cd \quad (2.63)$$

Define-se, a absorbância, $A(\lambda)$, como ,

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) \quad (2.64)$$

e convertendo para o logaritmo na base 10, a equação (2.64), temos:

$$A(\lambda) = \left(\frac{\epsilon}{\log 10}\right).Cd = \epsilon \bullet Cd \quad (2.65)$$

portanto, encontra-se a absorbância como,

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_\lambda^0}{I_\lambda}\right) = \epsilon^\bullet \cdot Cd \quad (2.66)$$

onde, ϵ^\bullet , é novamente o coeficiente de absorção molar (em, $L.mol^{-1}.cm^{-1}$), C é a concentração (em, $mol.L^{-1}$) de espécies absorvedoras e, d , (em cm) é o caminho óptico por onde a luz foi absorvida, ou seja, a espessura da amostra (Cantor et al., 1980).

2.10 Espalhamento de raios X a baixo ângulo

A técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (*Small angle X-Ray Scattering, SAXS*) está baseada na análise do espalhamento de raios X de um material a ângulos muito pequenos. Qualquer evento de espalhamento é caracterizado por uma lei recíproca entre tamanho da partícula e ângulo de espalhamento (Glatter e Kratky, 1982).

O espalhamento de raios X a baixo ângulo tem sido amplamente utilizado para estudos estruturais de macromoléculas de interesse biológico e proteínas (Feigin e Svergun, 1987). Nesta seção, apresentamos as equações básicas necessárias para entender os princípios dessa técnica. Informações mais detalhadas podem ser encontradas em livros didáticos (Glatter e Kratky, 1982; Schmidt, 1995).

Nos experimentos de SAXS, um feixe de raios X policromático que sai da fonte do aparelho atravessa um monocromador responsável por selecionar uma pequena faixa de comprimentos de onda da ordem de 0.1 nm aproximadamente. Então, o feixe monocromático passa por um colimador com um vetor de onda, \vec{k}_0 , e interage com os elétrons da amostra fazendo com que os mesmos oscilem senoidalmente. A radiação emitida de cada elétron é espalhada, sendo cancelada em algumas direções e em outras superpostas (interferência construtivas). Quando as ondas interferem construtivamente, a diferença de fase entre os feixes espalhados com vetor de onda, \vec{k}_s é considerada pequena. Além disso, a intensidade do feixe detectado alcança seu valor máximo para um ângulo de espalhamento, 2θ , conforme ilustra a Figura 16. O espalhamento de raios X a baixos ângulos é considerado como elástico, pois $|k_0| \equiv |k_s|$.

Agora, introduziremos a densidade eletrônica, $\rho(\vec{r})$, como o número de elétrons por unidade de volume na posição, r , de uma partícula que está fixa no espaço. Portanto, a amplitude de espalhamento total, $A(\vec{q})$, irradiada pelos elétrons, contidas na partícula

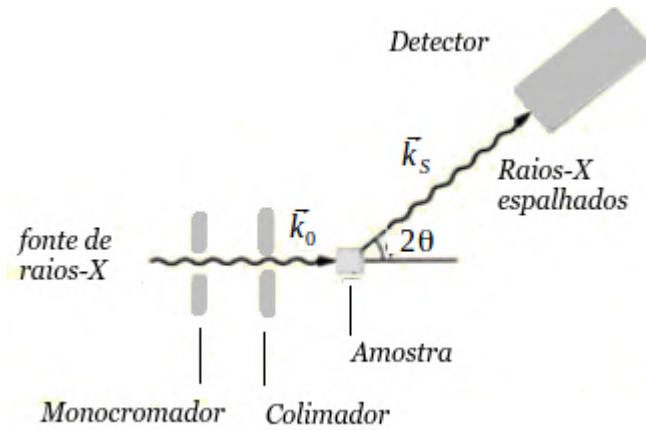


Figura 16: Esquema ilustrativo da medida de SAXS

de volume, V , é dada pela Transformada de Fourier da densidade eletrônica :

$$A(\vec{q}) = A_e \int_V \rho(\vec{r}) \cdot e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r} \quad (2.67)$$

onde, A_e , denota a amplitude de espalhamento de um elétron.

A intensidade espalhada pela partícula, $I_0(\vec{q})$, pode ser mensurada por meio do produto da amplitude pela amplitude complexa, $A(\vec{q})^*$,

$$I_0(\vec{q}) = A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^* = I_e \int_V \rho(\vec{r}) \cdot \rho(\vec{r}^*) \cdot e^{-i\vec{q} \cdot (\vec{r} - \vec{r}^*)} d\vec{r} d\vec{r}^* \quad (2.68)$$

onde a intensidade de espalhamento do elétron, I_e , pode ser dada pela fórmula de Thomson, veja (Laue, 1960). Definimos, $\rho^2(\vec{r}) = \int_{V^*} \rho(\vec{r}) \cdot \rho(\vec{r} - \vec{r}^*) d\vec{r}^*$, como o quadrado da convolução (Bracewell, 1986), portanto, a equação 2.68 se reduz para a equação (2.69).

$$I_0(\vec{q}) = I_e \int_V \rho^2(\vec{r}) e^{-i\vec{q} \cdot (\vec{r} - \vec{r}^*)} d\vec{r} \quad (2.69)$$

Até agora as considerações feitas foram para uma partícula fixa no espaço. No entanto, em sistemas reais, as partículas não estão fixas. Portanto, devemos tomar a média sobre todas as orientações da partícula. No espaço recíproco isso é feito tomando-se a média sobre o ângulo sólido Ω , o qual leva, $\langle e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \rangle_{\Omega} = \frac{\sin(qr)}{qr} dr$, (Debye, 1915) e a equação 2.69 se reduz a forma :

$$I_0(q) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (2.70)$$

onde a função, $p(r) = r^2 \Delta \rho^2(r)$, é chamada de distribuição de pares de distâncias, e é uma função no espaço real que fornece informações sobre a forma das partículas a partir da intensidade espalhada $I_0(q)$.

O modelo tratado até agora foi para o espalhamento de uma única partícula. Para um sistema de partículas em solução, aleatoriamente orientadas, a intensidade espalhada pelo sistema é escrita pela equação,

$$I(q) = N \langle P(q) \rangle \cdot \langle S(q) \rangle \quad (2.71)$$

onde N corresponde ao número de partículas alvo, e $P(q) = \langle P(q) \rangle$ e $S(q) = \langle S(q) \rangle$, são os fatores de forma da partícula e estrutura, respectivamente.

O fator de forma depende apenas da forma das partículas. Se o sistema for monodisperso, a forma das partículas não muda e $P(q) = I_0(q)$. Se o sistema for polidisperso, o fator de forma incluirá a média sobre todas as possíveis formas, tamanhos e densidades eletrônicas das partículas.

O fator de estrutura está relacionado a interações entre partículas e as possíveis estruturas que elas podem formar. Para sistemas diluídos (não interagentes), $S(q) \rightarrow 1$ e a intensidade espalhada só dependerá do fator de forma, $I(q) \sim P(q)$. Para sistemas concentrados, $S(q)$, deve ser levado em conta, a fim de que a intensidade espalhada seja perfeitamente entendida.

Para a análise de nossos dados de SAXS, levaremos em consideração a contribuição das *AgNPs* e biomoléculas do meio de cultura, composto por uma mistura contendo DMEM e 10% de SFB (v/v), conforme descrito na próxima seção.

CAPÍTULO 3

“Estamos en este mundo para convivir en armonía. Quienes lo saben no luchan entre sí”

Gautama Buda

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, serão apresentados os materiais empregados no estudo, como reagentes, meios de cultura, etc, bem como descritas as metodologias utilizadas na preparação de todas as amostras, como a síntese das nanopartículas, cultivos celulares, extrações metabólicas, etc.

3.1 Materiais

Células: Macrófagos murinos com designação *RAW 264.7*, foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, Virginia, United States). Endoteliais humanas com designação *HUV-EC-C*, foram também adquiridas da American Type Culture Collection. Fibroblasto humano normal designado como *FN1*, foi obtido em colaboração com o Prof. Durvanei Augusto Maria do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã. (São Paulo, São Paulo, Brasil). Nanopartículas de prata: *AgNPs*, foi obtida em colaboração com os Prof. Koiti Araki do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química - Universidade de São Paulo (São Paulo, São Paulo, Brasil). Meio de cultura: *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*, foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States). Soro fetal bovino inativado/estéril (*SFB*), foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States). PBS: *Phosphate buffered saline*, foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, Missouri, United States). Hank Balanced Salts: foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, Missouri, United States). Água ultrapura padrão Milli-Q (Milipore) e Methanol 1/1 padrão analítico também foram utilizados nos experimentos.

3.2 Preparação das amostras

3.2.1 Preparação do meio de cultura

A solução de meio de cultura celular estoque foi preparada através da diluição de 50 mL de SFB em 450 mL de DMEM, obtendo uma solução na proporção de (1/10) chamada DMEM suplementado, que foi utilizada como meio basal para sustentar o crescimento, proliferação e diferenciação das linhagens celulares *FN1*, *HUV-EC-C* e *RAW 264.7*.

3.2.2 Construção do banco de células

O processo de construção do “banco celular padronizado” das linhagens celulares endoteliais (*HUV-EC-C*), fibroblastos (*FN1*) e macrófagos (*RAW 264.7*), consiste no descongelamento das células segundo o protocolo interno do laboratório (*LabM²*) (ver Anexo-1) e, em seguida transferidas para frascos de cultura (25 cm^2 de área para adesão celular) contendo DMEM suplementado, e conduzidas para dentro da incubadora com 95% de ar previamente umidificado e filtrado e 5% de dióxido de carbono (CO_2) a temperatura de 37 C^0 .

Atingida a confluência celular (Fiocruz e Guimarães, 2017), foi realizado o processo de repique ou passagem (ver Anexo 2), na qual, as células endoteliais e fibroblastos são lavadas com solução PBS (*phosphate-buffered saline*) e os macrófagos com solução *Hank Balanced Salts*. Após a lavagem, as células são submetidas ao processo de “liberação” da área de adesão celular. Para isso, as células endoteliais e fibroblastos são tripsinizadas. Entretanto, os macrófagos são raspados com o uso de uma pequena espátula. Após a liberação, as células são transferidas para novos frascos de cultura (75 cm^2 de área para adesão celular) com adição de meio de cultura fresco (Fiocruz e Guimarães, 2017). Atingida a confluência celular novamente, este processo é repetido até 4 vezes para obtenção da passagem de número 4 (*P4*), considerando como número 0 o momento do descongelamento.

Posteriormente, estas linhagens celulares foram congelados em 25 *vials* (ver anexo 2), contendo cada vial aproximadamente $2 \times 10^6\text{ cel}$, construindo assim, um “banco celular padronizado”, o qual foi usado em nossas experiências.

3.2.3 Preparação das nanopartículas de prata

Dispersões estáveis de *AgNPs* com 40 nm de diâmetro médio e de formato esférico, na concentração de 27.3 mg/L (250.3 μ M) de prata determinada por ICP-OES, foram sintetizadas utilizando-se uma adaptação do método Turkevich (Turkevich, et al., 1951). O método consiste no refluxo da sal de prata com ácido cítrico, o qual atua como agente estabilizador, em solução aquosa.

Resumidamente, 4.25 mg de nitrato de prata (anhidro $\geq 99.999\%$ base de metais) foi solubilizado em 100 mL de água ultrapura (18 M Ω .cm) e aquecida. Em seguida, 1 mL de uma solução de ácido cítrico com 0.5 mol.L⁻¹ (anhidro $\geq 99.5\%$) foi adicionado à solução de prata fervente, e mantido sob agitação por 5 minutos. Em seguida, o volume final da reação foi deixado para resfriar à temperatura ambiente e em seguida filtrado através de uma seringa membrana celulose estéril de 0.2 μ m. Finalmente, a concentração real de prata elementar foi determinada por ICP-OES e armazenada sob refrigeração a 4 °C. A concentração final foi determinada baseando-se a uma curva de calibração preparada utilizando soluções de padrão analítico de prata (1000 ppm) em ácido nítrico.

3.3 Protocolos de preparação de amostras segundo o tipo estudo

Nesta seção, apresentamos alguns controles específicos para o preparo das amostras biológicas. Definimos como controles, protocolos específicos de preparação de amostras segundo o tipo de estudo. Estes protocolos serão utilizados para elaborar o arranjo de concentrações de *AgNPs* em função do tempo de exposição que caracterizam as chamadas dosagens sub-letais e letais, cruciais para os estudos de caracterização das *AgNPs*, viabilidade celular e metabolômica com RMN (ver Tabela 4). Desse modo, os resultados aqui apresentados estão diretamente ligados aos resultados que serão discutidos no capítulo 4.

3.3.1 Caracterização de *AgNPs*

Para caracterizar as nanopartículas de prata (*AgNPs*) em meio de cultura, a preparação das amostras passaram por dois controles.

3.3.1.1 Diluição da dispersão estoque de AgNPs

Soluções de AgNPs em DMEM suplementado foram preparadas nas concentrações 25, 50, 75 e 100 μM que foram previamente determinadas a partir de estudos exploratórios realizados em nosso laboratório, discussões com a equipe de pesquisadores envolvida neste estudo, além de consultas em artigos e teses relacionadas.

3.3.1.2 Incubação em diferentes tempos

Após a obtenção das concentrações, estas foram aliqüotadas adicionando 1.5 mL da amostra em poços de cultivo para cada ensaio de caracterização (SAXS, DLS, potencial zeta, absorção UV-vis e imagens de turbidez) (Ver Figura 17), e em seguida colocadas dentro da incubadora, utilizando as mesmas condições experimentais utilizadas para as células, e deixadas incubar por 24 e 48 h. Após a incubação para cada intervalo de tempo, as medidas foram realizadas e os dados coletados. As metodologias experimentais empregadas em cada experimento serão detalhadas nas seções 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4.

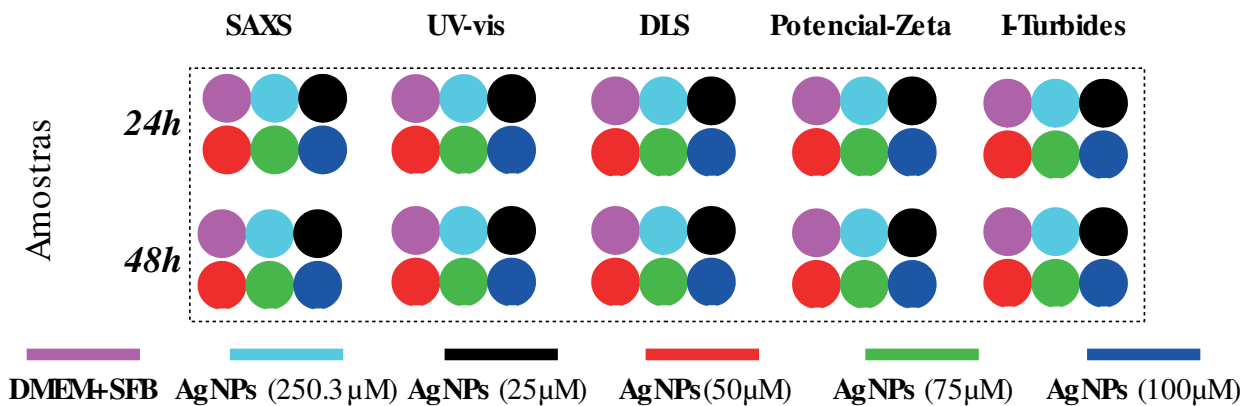


Figura 17: Estratégia planejada para os estudos da caracterização das AgNPs em meio de cultura.

3.3.2 Ensaio de viabilidade celular

Para as experiências de viabilidade celular, as células endoteliais, fibroblastos e macrófagos passaram por três etapas distintas a fim de atender adequadamente as demandas experimentais em cada ensaio de caracterização.

3.3.2.1 *Descongelamento das células*

Inicialmente, as três linhagens celulares foram descongeladas do “banco padronizado” e colocadas novamente em cultura conforme descrito anteriormente (ver Anexo 2). Atingida a confluência após 48h para um frasco de cultura de (75 cm²), as células passaram pelo processo de lavagem e liberação da área de adesão celular para, em seguida, serem centrifugadas a fim de remover resquícios do meio de cultura. Ao final deste processo, as linhagens celulares foram contadas manualmente com o auxílio do hemocitômetro, obtendo-se estoques celulares com concentrações de $\approx 4 \times 10^6 \frac{cel}{mL}$, em 2 mL de meio de cultura.

3.3.2.2 *Plaqueamento das células*

Após a obtenção dos estoques celulares para cada linhagem, estas foram plaqueadas de acordo com o tipo de experiência de viabilidade celular:

- Citotoxicidade : Os efeitos citotóxicos das *AgNPs* foram estudados estimando as taxas de proliferação celular através de ensaios de contagem em câmara Neubauer. A estratégia experimentalmente foi utilizar 2 (duas) placas de 24 poços por linhagem celular. A concentração de células e volume total para realizar esta experiência por linhagem celular foi de $[cel] \approx 2 \times 10^5 \frac{cel}{mL}$, em 24 mL de meio de cultura. Cada poço de cultivo é re-suspendido com 0.5 mL desta solução celular.
- Atividade metabólica celular : O potencial metabólico celular das células tratadas com *AgNPs* foi avaliado através de ensaios MTT. A estratégia experimental consistiu em usar 2 (duas) placas de 96 poços por linhagem celular, sendo utilizado somente 30 poços. A concentração de células e volume total para realizar esta experiência por linhagem celular foi de $[cel] \approx 1 \times 10^5 \frac{cel}{mL}$, em 14 mL de meio de cultura. Cada poço de cultivo é re-suspendido com 0.22 mL desta solução de células em meio de cultura.
- Cinética de crescimento celular (CDC) : O levantamento da curva de crescimento celular em função da *AgNPs*, obtido através da contagem em câmara de Neubauer, foi realizado em 1 (uma) placa de 96 poços por linhagem celular, sendo utilizado somente 72 poços. A concentração de células e volume para realizar esta experiência

por linhagem celular foi de $[cel] \approx 1 \times 10^5 \frac{cel}{mL}$, em 16 mL de meio de cultura. Cada poço de cultivo é re-suspensionado com 0.22 mL desta solução celular.

Após o plaqueamento para cada estudo, as linhagens celulares permaneceram incubadas por 12 horas para se aderirem aos poços, antes de iniciar o tratamento com as *AgNPs*.

3.3.2.3 Tratamento das células com (*AgNPs*)

Após as 12 horas de incubação, o meio de cultura usado foi retirado das placas, e em seguida alíquotas de 25, 50, 75, 100 e 185 μM de *AgNPs*, assim como meio de cultura suplementado e fresco (controle ou 0 μM) foram adicionadas nos poços de cultivo, para cada tipo de ensaio de viabilidade, formando assim, as amostras indicadas pela Figura 18.

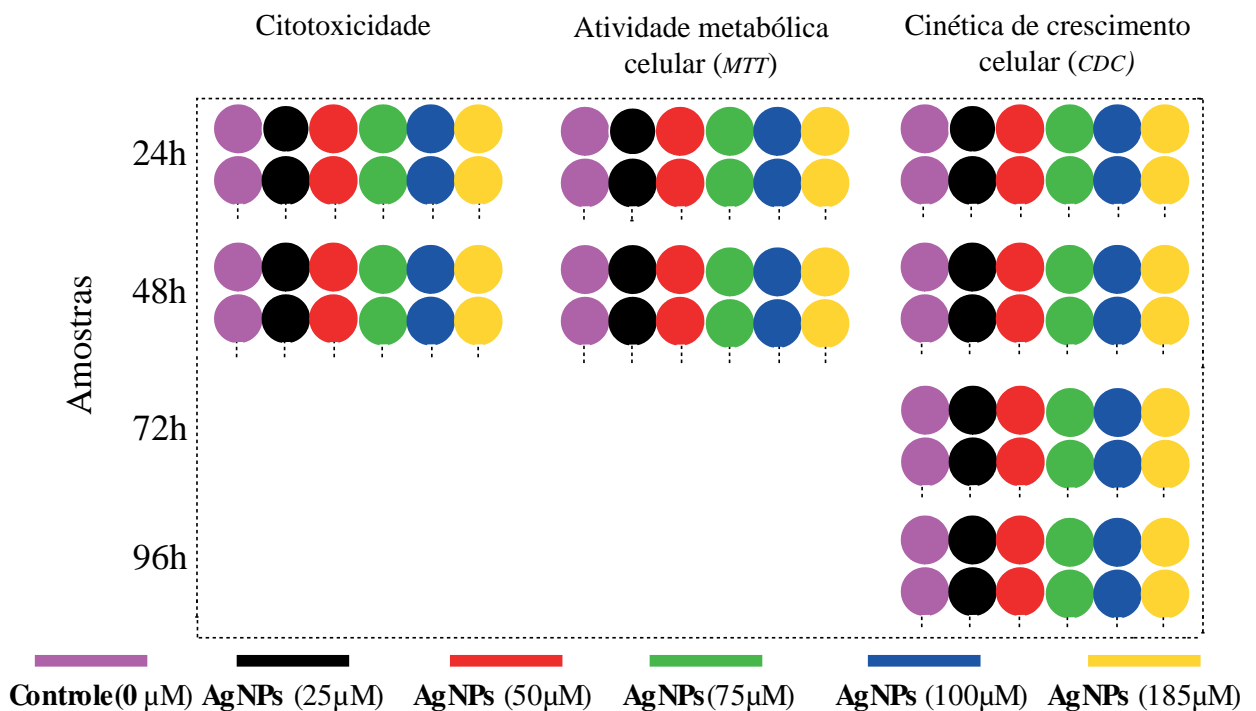


Figura 18: Tratamento com as *AgNPs* em função das concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 185 μM) e dos intervalos de tempo de cultivo (24h, 48h, 72h e 96h).

Após o tratamento com as *AgNPs* para os três estudos de viabilidade, as linhagens celulares (FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7) permaneceram incubadas em diferentes intervalos de tempo. Por exemplo, para os ensaios de citotoxicidade com câmara de Neubauer (CCN) e atividade metabólica (MTT), as linhagens celulares estiveram incubadas por 24 h e 48 h (Figura 18). Entretanto, para levantar a curva de crescimento de cada linhagem

celular, foram utilizados ensaios de CCN tal que, as linhagens estiveram incubadas por 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (Figura 18). Após, a realização dos tratamentos para cada intervalo de tempo, as medidas experimentais foram feitas e os dados coletados. Esses processos serão melhor detalhados na seção 3.4.5 e 3.4.6.

3.3.3 Método da metabolômica através da RMN

Para as experiências RMN, as três linhagens celulares passaram novamente por controles para se adequar a estratégia proposta para este estudo.

3.3.3.1 Descongelamento das células

Conforme descrito na seção anterior (3.3.1), as três linhagens celulares foram descongeladas do “banco padronizado” e colocadas em cultura, obtendo-se estoques celulares para cada linhagem, com uma concentração de $4 \times 10^6 \frac{cel}{mL}$, em 14 mL de solução celular.

3.3.3.2 Plaqueamento das células

Após a obtenção dos estoques celulares, estas foram plaqueadas em 16 placas de 6 (seis) poços por linhagem celular. A concentração de células e volume estoque para realizar esta experiência foi de, $[cel] \approx 3 \times 10^5 \frac{cel}{mL}$, em 192 mL de meio de cultura, sendo que cada poço de cultivo contém 2 mL de volume a ser preenchido com a solução de células. Novamente conforme descrito na seção anterior (3.3.1), após o plaqueamento, as linhagens celulares permaneceram incubadas por 12 horas antes de iniciar o tratamento com as *AgNPs*.

3.3.3.3 Tratamento das células com (*AgNPs*)

Após as 12 h de incubação, o meio foi retirado das 16 placas e em seguida cinco concentrações diferentes de *AgNPs* (25, 50, 75, 100 e 185 μ M), assim como o meio de cultura suplementado e livre de nanopartículas (controle ou 0 μ M) (Wong, et al., 2009; Liu, et al., 2010) foram adicionadas nos poços de cultivo (ver a Figura 19). Após o tratamento para cada linhagem celular (FN1, HUV-E-C e RAW 264.7) com *AgNPs*, dois grupos de oito placas foram divididas. O primeiro grupo permaneceu incubado com um tempo de exposição de 24 horas, e o segundo com 48 horas (ver a Figura 19).

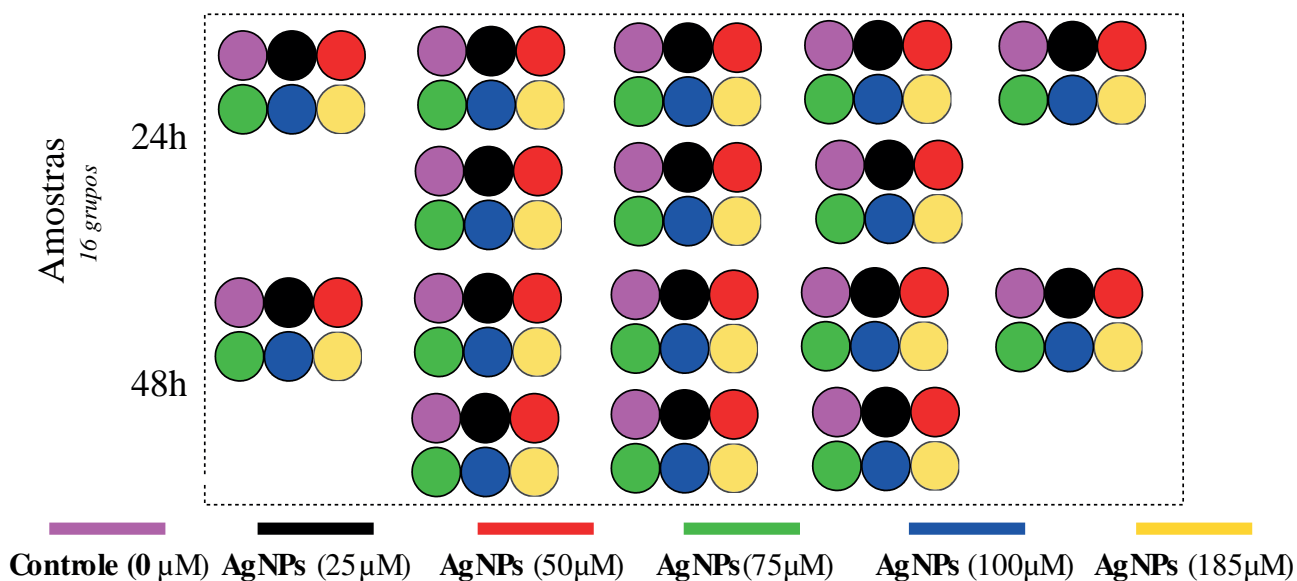


Figura 19: Tratamento com as AgNPs em função das concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 185 µM) e dos intervalos de tempo de cultivo (24 h e 48 h).

Após, a realização das experiências para cada intervalo de tempo, as amostras foram coletadas e deu início a extração metabólica das células e o processo de separação do meio de cultura, para cada tipo de linhagem celular. Estes processos serão detalhados na seção 3.4.7.

Tabela 4: Resumo da estratégia de preparação de amostras para os estudos de caracterização, viabilidade celular e metabolômica. A Tabela indica as doses, tempos de incubação e o número de réplicas de cada dose de AgNPs para cada estudo.

Experimento	Doses (µM)	Incubação (horas)	Replica por dose	Total de poços cultivados
Caraterização de AgNPs				
SAXS	0/25/50/75/100/250.3	24/48	3	36
UV-vis	0/25/50/75/100/250.3	24/48	3	36
DLS	0/25/50/75/100/250.3	24/48	3	36
P.Zeta	0/25/50/75/100/250.3	24/48	3	36
I.Turbidez	0/25/50/75/100/250.3	24/48	3	36
Viabilidade celular				
CDC	0/25/50/75/100/185	24/48/72/96	3	72
Citotoxicidade	0/25/50/75/100/185	24/48	4	48
MTT	0/25/50/75/100/185	24/48	5	60
Metabolômica				
RMN	0/25/50/75/100/185	24/48	8	96

3.4 Métodos Experimentais

3.4.1 Espalhamento de luz dinâmico

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas no equipamento Zetasizer Malvern, modelo *Nano – ZS⁹⁰*, Worcestershire, UK, do Laboratório de BioMembranas, IFUSP. A cubeta de quartzo de caminho ótico 10 *mm*, desenhada para esse equipamento, foi preenchida com um volume de 1.5 *mL* da dispersão estoque *AgNPs* (250.3 μM), meio de cultura suplementado (10% SFB+DMEM), SFB e DMEM, assim como as concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM *AgNPs*.

As medidas foram realizadas com um ângulo fixo de 90°, a uma temperatura de 37°C. A função de auto-correlação da intensidade da luz espalhada, $g^{(2)}(\tau)$, da equação 2.55 (seção 2.7) foi diretamente obtida pelo correlator da Malvern.

A função de auto-correlação do campo elétrico, $g^{(1)}(\tau)$ (equação 2.54), foi analisada pelo método dos cumulantes de segunda ordem (Koppel,1975).

O coeficiente de difusão translacional, D , foi obtido pelo programa de aquisição, com o uso da equação 2.55, ($\Gamma = Dq^2$).

Por fim, a dimensão dos centros espalhadores pode ser obtida em termos de um raio efetivo, com a relação de Stokes-Einstein (equação 2.51). As medidas foram cordialmente viabilizadas pela Profa Teresa e o Dr. Evandro.

3.4.2 Potencial – zeta

As medidas do potencial-zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer Malvern modelo *Nano – ZS⁹⁰*, Worcestershire, UK, do Laboratório de BioMembranas, IFUSP. A cubeta de plástico, modelo Folded Capillary-DTS1060 desenhada para esse equipamento, foi preenchida com um volume de 600 μL da dispersão estoque *AgNPs* (250.3 μM), meio de cultura suplementado (10% SFB+DMEM), SFB e DMEM, assim como as concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM *AgNPs*.

As medidas foram realizadas com um comprimento de onda de 633 *nm*, com um ângulo de detecção fixo a 17° e temperatura de 37 °C.

Como mencionado na seção 2.8, a mobilidade eletroforética, μ , das partículas que se movimentam num campo elétrico, foi diretamente coletada pelo equipamento através da mudança de frequência da luz laser espalhada. Conhecendo-se a mobilidade eletro-

forética, μ , foi possível calcular o potencial de superfície junto ao plano de cisalhamento da partícula, também chamado de potencial-zeta (ζ). Para isso, usa-se a aproximação de Smoluchowski (equação 2.59). As medidas foram cordialmente viabilizadas pela Profa Teresa e o Dr. Evandro.

3.4.3 Absorção óptica

As medidas de absorção foram realizadas com o uso de um espectrofotômetro, marca Varian, modelo Cary 50, Santa Clara, CA, EUA, do Laboratório de BioMembranas, IFUSP. As amostras contendo 1 mL de dispersão foram colocadas em uma cubeta de quartzo (0.2 x 1.0 cm) com caminho ótico de 0.2 cm. As medidas foram realizadas com controle de temperatura do tipo *Peltier thermostatte*, instalado no próprio aparelho, com precisão de ± 0.1 °C. Medimos a absorbância da dispersão estoque *AgNPs* (250.3 μ M), meio de cultura suplementado (10% SFB+DMEM), SFB e DMEM, assim como as concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ M, com comprimento de onda de luz incidente variando de 200 a 800 nm e na temperatura 37 °C. As medidas foram cordialmente viabilizadas pela Profa Teresa e o Dr. Evandro.

3.4.4 Espalhamento de raios X a baixo ângulo

As medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) foram realizadas usando o equipamento EMUSAXS Multiuser SAXS, do Laboratório de Fluidos Complexos, IFUSP. As medidas foram cordialmente viabilizadas pelo Prof.Dr. Cristiano L.P de Oliveira. As amostras contendo 0.4 mL foram mantidas em capilares de quartzo reutilizável com diâmetro médio de 1.5 mm.

Medimos a intensidades da radiação espalhada expressada como uma função recíproca do espaço de momento de módulo, $q = 4\pi \frac{\sin(\theta)}{\lambda}$, da dispersão estoque *AgNPs* (250.3 μ M) e meio de cultura suplementado (10% SFB+DMEM), assim como das concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ M, na temperatura 37 °C. A funções q obtidas foram corrigidas usando o espalhamento de fundo, capilar vazio e transmissão da amostra, passando pela posterior normalização para escala absoluta usando como padrão a água. A radiação foi gerada pela fonte *GENIXTM* (Cu K α , $\lambda=1.54$ Å)

Para o tratamento dos dados utilizou-se o pacote SUPERSAXS (Oliveira e Pedersen, 2009).

3.4.5 Ensaio calorimétrico MTT

As medidas de MTT foram realizadas no espectrofotômetro para leitura de placas Biotek modelo Power wave XS2, Vermont, EUA, do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, cordialmente viabilizadas pelo Prof Marco Antonio.

Após o tratamento com a prata para cada tempo de exposição (ver seção 3.3.2), as placas de 96 poços, modelo Costar desenhada para esse equipamento, foram lavadas com PBS até por três vezes. Realizado a lavagem, 30 poços de cultivo foram acionados 100 μL de uma solução 0.5 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ de MTT. Após 2 horas de incubação a 37 °C, a solução de MTT foi removida. Os cristais remanescentes de sal formazan insolúveis em água que se formaram foram dissolvidas em 100 μL de DMSO.

As medidas foram realizadas com um comprimento de onda de 570 nm , e temperatura fixa a 24 °C.

3.4.6 Câmara de Neubauer

A etapa de contagem das células, vivas e mortas, foi realizada em uma câmara de Neubauer ou hemocitômetro modelo *OptikLabor*, Germany, do Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular (*LabM²*), IFUSP.

O processo de contagem das células, tanto nas placas de 24 (estudo de citotoxicidade) como nas de 96 poços (estudo de cinética de crescimento), é baseado segundo o protocolo de contagem do Laboratório (*LabM²*) (ver anexo 3). Alíquotas de 50 μL da solução de células com meio de cultura suplementado, assim como nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 185 μM de *AgNPs*, foram recolhidas e utilizadas para preencher a câmara de Neubauer. Em seguida, foi realizada a contagem das células nos quadrantes superior e inferior, obedecendo a equação (2.49) mostrada na seção 2.6.

3.4.7 Extração metabólica

Antes da realização das experiências de *RMN*, as amostras de células tratadas com *AgNPs* conforme descrito na seção 3.3.3, passaram pelo processo de "extração metabólica" responsável pela lise das macroestruturas celulares até suas componentes moleculares básicas, como os ácidos orgânicos, aminoácidos e lipídeos de baixo peso molecular

(até 100 Da). Nessa etapa, foi seguido um protocolo elaborado em nosso Laboratório (*LabM*²) (ver anexo 4) (Huifeng, et al., 2008). Foi coletado e tratado todo material resultante do processo das passagens, ou seja, as células com seus respectivos meios de cultura (ver Figura 20).

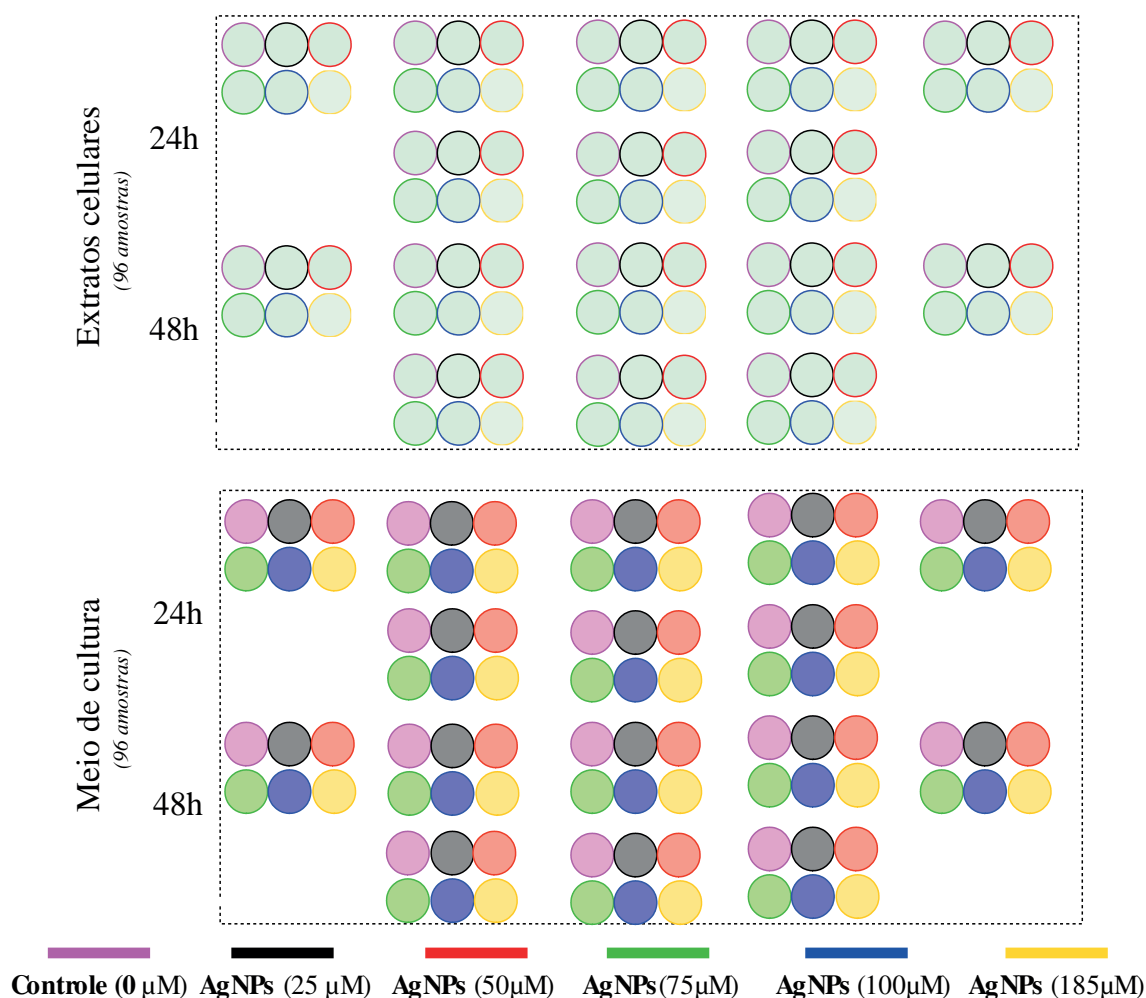


Figura 20: Esquemas de coleta das células e dos respectivos meios de cultura, após o tratamento com AgNPs. Cada esquema deve ser considerado triplicado uma vez que foram utilizadas 3 (três) linhagens celulares no trabalho: FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 por experiência de RMN.

Inicialmente, os meios de cultura são coletados e centrifugados 2 (duas) vezes a fim de precipitar células que não estavam aderidas ao substrato. Em seguida, separam-se os sobrenadantes contendo apenas o meio para serem acondicionados em ependorfes de 2 mL próprios para liofilização (*vials*) e armazenados no ultra-freezer (-70°C).

As células resultantes, com e sem tratamento de AgNPs são, pela última vez, lavadas com PBS e tripsinizadas para também passar pela centrífuga a fim de remover resquícios do meio de cultura. Este processo é executado 3 (três) vezes para garantir

que sejam retidas apenas células em ependorfes de 2 *mL*. Após o processo de purificação por lavagens, adicionam-se 0.5 *mL* de solução metanol/água gelada na proporção (1/1) e homogeneizar levemente.

Na etapa seguinte, a suspensão celular em água/metanol, passa pelo tratamento com ultrassom que contribui para a lise das mesmas resultando no processo conhecido como “extração metabólica” (Huifeng, et al., 2008) onde o produto final é um composto de moléculas orgânicas de baixo peso molecular (aproximadamente, 100 *Da*), chamadas metabólitos, que foram os objetos de análise por ressonância magnética nuclear. Finalmente, esta solução passou pela centrifugação a (4°C e 2200 *r.p.m.* durante 90 *min*), e se coletou os sobrenadastes resultantes que são acondicionados nos ependorfes e armazenados no ultra-freezer.

A etapa final de preparação das amostras de ressonância, extrato celular e meios, envolve o processo de liofilização durante aproximadamente 24 *h* no laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Uma vez finalizado o processo de liofilização, os extratos resultantes das amostras celulares e meios de cultura, são ressuspensos com soluções *DSS* (padrão de referência do deslocamento químico; 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) em água deuterada (D_2O), nas concentrações de 5.0 *mM* para meios de cultura e 0.5 *mM* para extratos celulares. O volume destas soluções adicionado aos extratos de células e meios de cultura, foi de 0,5 *mL* para cada tipo de amostra. Em seguida, as amostras são transferidas para tubos de ressonância (5 *mm*) e analisadas imediatamente no espectrômetro de ressonância magnética.

3.4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (1H -RMN)

As medidas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (*RMN*) foram realizadas num espectrômetro de marca *Varian* para amostras líquidas (California, USA), instalado no Laboratório de Química e Manufaturados do Centro de unidade de negócio e Bionanomanufatura, IPT. O equipamento apresenta três canais e gradientes de campo pulsado, acoplado a uma sonda de ressonância tripla de 5 *mm* (H^1 , C^{13} , N^{15}), operando com uma frequência constante de 400 MHz para o isótopo 1H (próton).

3.4.8.1 Aquisição dos espectros de RMN

Em geral, os espectros RMN das amostras de extratos celulares e meios de cultura, foram obtidos em um campo magnético de $9.4 T$ e uma frequência de $400 MHz$ à $25^\circ C$, utilizando a combinação de sequência de pulsos PRESAT+NOESY-1D (Le Guennec et al., 2017) e saturação de água residual. Adicionalmente, o tempo de saturação de $1.0 s$, pulsos de excitação ($t_p(90^\circ)$) de $7.5 \mu s$, tempo de mistura (t_m) de $150 ms$, e aproximadamente $2 s$ de pulso seletivo de saturação água aplicado a $4.7 ppm$ respectivamente ao DSS. Para as amostras de extrato celular, a janela espectral (sw) de $10 ppm$, com 16384 pontos complexos e 1228 transitórios *per* sinal, foi equivalente a aproximadamente duas horas e meia de aquisição por amostra. Para as amostras de meio de cultura, a janela espectral (sw) de $12 ppm$, com 38460 pontos complexos e 164 transitórios *per* sinal, foi equivalente a aproximadamente 16 minutos de aquisição por amostra.

A homogeneização do campo magnético por meio de procedimentos de *shimming* foi realizada antes de cada aquisição para garantir uma resolução espectral adequada para alcançar a largura da linha a valores de meia altura (LWHH) do DSS na faixa de 0.5 a $1.5 Hz$ para as amostras. As razões espectrais de sinal-ruído (SNRs) foram calculadas e utilizadas para determinar o nível de incerteza das medições que resultaram em 383 ± 230 e 6375 ± 2508 , respectivamente, para extratos celulares e meio de cultura.

3.4.8.2 Processamento dos espectros de RMN

Após a obtenção dos sinais FIDs de RMN, o processamento e a extração de dados gerados foi realizado no software *Chenomx NMR Suite* (© Copyright 2009 - 2021 *Chenomx Inc*). Podemos dividir em 4 (quatro) ações o processamento dos sinais até se obterem os espectros analisáveis, resumidas e descritas a seguir: (1) aplicar filtro exponencial de $0.3 Hz$ na transformada de Fourier (“Line Broadening”) para suavizar os espectros o que equivale a aumentar matematicamente a razão sinal/ruído, (2) ajustar a fase (“Phase correction”) para garantir que o espectro esteja em modo absorptivo, (3) aplicar a correção de linha de base (“Baseline correction”) e (4) normalizar os espectros para garantir os requisitos da análise: primeiro, o deslocamento químico no eixo-X foi ajustado, definindo a sinal de DSS em $0 ppm$ e ajustando a área do DSS à concentração correspondente nas amostras, ou seja, $0.5 mM$ para extratos celulares e $5.0 mM$ para

meio de cultura. A segunda normalização foi realizada através da determinação da área total no intervalo de 0.7-8.6 *ppm* (não foi considerado a sinal da água), e dividindo as suas intensidades pelas áreas correspondentes.

Estas ações de normalização evitam a) problemas relativos a alterações no *pH* da amostra, que poderiam mudar a posição de deslocamento químico das linhas de alta resolução e pequenas alterações no ganho do espectrômetro de ressonância (primeira normalização); e b) mudanças na massa liofilizada dos extratos celulares e meio de cultura a partir da eventual variabilidade biológica que poderiam influenciar nos valores das áreas metabólicas nos espectros (segunda normalização) (Bloise et al. 2020).

3.4.8.3 *Identificação de metabolitos*

Apos o tratamento dos FIDs e gerar os espectros, a identificação das linhas de alta resolução e a determinação das respectivas áreas associadas às moléculas, obtida de maneira relativa a partir da área dos sinais que compõem os espectros, foi realizada através de ajustes dos sinais por meio de funções do tipo lorentzianas e/ou gaussianas.

3.4.9 **Análise multivariada**

Os dados de entrada para a análise multivariada correspondem à pequenas porções de áreas, organizadas em uma forma matricial (“matriz multivariada”), calculadas sob as linhas de alta resolução através ajustes por funções matemáticas conforme descrito anteriormente (seção 3.4.8.3).

O tratamento multivariado dos resultados de ^1H -RMN foi realizado através do software SIMCA-P (UmetricsTM, trial license, Malmö, Sweden) utilizando o método PLS-DA, *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*, disponível no módulo *Statistical Analysis*.

Os modelos gerados foram obtidos para 4 (quatro) componentes, com nível de confiança de 95% e um nível de significância de 0.05 atribuído as elipses T2 Hotelling (Wu et al. 2010). Foram analisados os gráficos de *Score plots* que indicam as tendências de amostras semelhantes representadas como grupos de pontos no espaço de coordenadas 2D através das (Comp. 1 vs. Comp. 2; Comp. 1 vs. Comp. 3; Comp. 2 vs. Comp. 3). Variáveis de importância na Projeção (*VIP score*), responsáveis por mostrar os metabolitos classificadores (ou áreas) em ordem descendente, foram cuidadosamente

analisadas para proceder às análises estatísticas univariadas necessárias para estabelecer a relevância estatística do método multivariado.

3.4.10 **Análise univariada**

Os resultados da análise multivariada foram testados para estabelecer um parâmetro numérico que comprove sua significância estatística ($p < 0.05$) utilizando o software Minitab (Minitab Inc., institutional license, State College, PA). Nesta etapa, o método univariado paramétrico ANOVA acoplado a Fisher-test e não paramétrico Kruskal-Wallis, foram utilizados de acordo com a normalidade dos dados previamente determinada através do teste Anderson-Darling assumindo hipótese nula como uma distribuição normal.

CAPÍTULO 4

“No escuchar, ver o decir lo que te lleve a hecer malas acciones ”

Nikko Tosho-gu

4 RESULTADOS

Neste capítulo apresentamos os resultados obtidos nesta tese e as discussões sobre os mesmos. Esta seção foi dividida em três partes: na primeira, estudamos a caracterização das propriedades morfo-elétricas da dispersão das nanopartículas de prata em meio de cultura celular suplementado (DMEM alta-glicose com 10% sêro fetal Bovino)(seção 4.1); na segunda parte, analisamos o efeito de citotoxicidade das *AgNPs* sobre as células através de estudos de viabilidade celular (seção 4.2). Finalmente, na terceira parte, verificamos e identificamos as cadeias de eventos metabólicos desencadeados pelos modelos celulares quando submetidos ao tratamento com *AgNPs* (seção 4.3).

4.1 Caracterização das Nanopartículas de prata (*AgNPs*)

Embora a citotoxicidade inerente das *AgNPs* estar sendo empregada como agente terapêutico (Nguyen, et al 2021), recentes trabalhos mostram que mudanças metabólicas em células relacionadas com efeitos citotóxicos de *AgNPs*, são dependentes da biodistribuição e da captação celular (Lategan et al., 2019), esta ultima dependente de propriedades físicas das *AgNPs* como tamanho, forma, composição e estado de agregação (Park et al., 2011). Logo, é esperado que nas diferentes soluções de *AgNPs* em meio de cultura deste trabalho, as biomoléculas do meio envoltas na superfície destas partículas, provoquem mudanças nas propriedades morfo-elétricas e, portanto, no comportamento toxicológico e uptake celular. Foram então realizados ensaios de caracterização das *AgNPs* em meio de cultura, após 24 e 48 h de incubação em uma incubadora com 95% de ar previamente umidificado e filtrado e 5% de dióxido de carbono (CO_2) a temperatura de $37^\circ C$, através de espalhamento de luz dinâmico (DLS), espalhamento de luz a baixos ângulos (SAXS), absorvância UV-vis, potencial-zeta (ζ) e imagens de turbidez para determinação da forma, diâmetro médio e estabilidade das nanopartícula.

4.1.1 Caracterização de AgNPs em citrato

Os principais resultados da caracterização morfo-elétrica para o estoque de AgNPs-Citrato = $250.3 \mu\text{M}$ em água ultra pura ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$), após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C , através de experiências do diâmetro médio, potencial-zeta, absorção UV-vis e SAXS, estão resumidos na Figura 21.

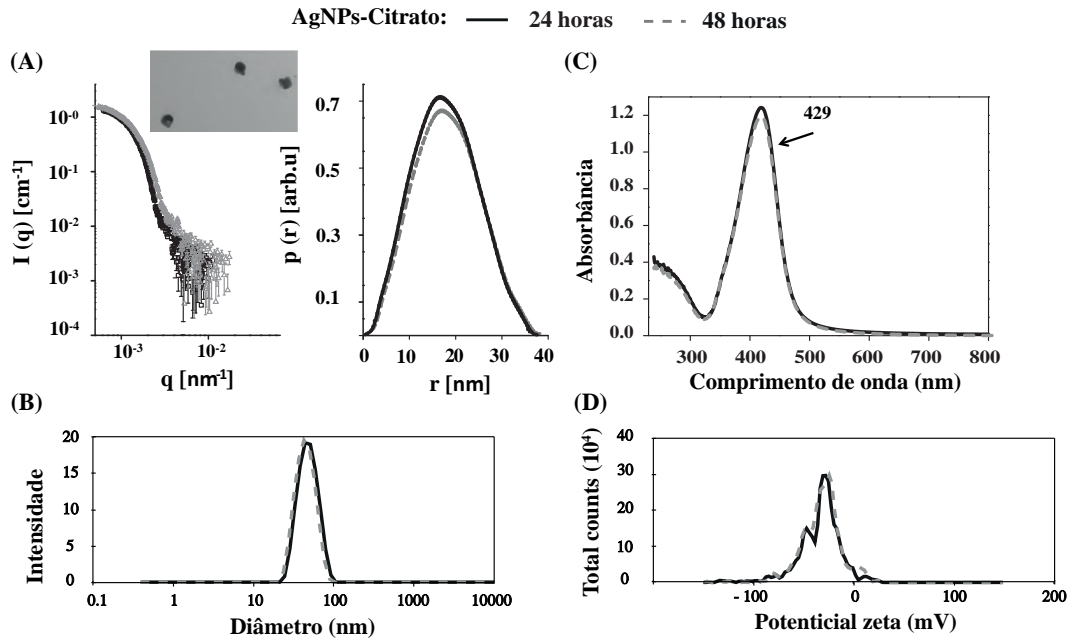


Figura 21: Caracterização morfo-elétrica para o estoque de nanopartículas (AgNPs-Citrato= $250.3\mu\text{M}$ diluída em água ultra pura), após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C , obtida através de experiências de SAXS (A), DLS (B), absorção UV-vis (C) e potencial de superfície zeta (D)

Da Figura 21 e Tabela 5, pode-se ver que após a incubação por 24 e 48h, as AgNPs-citrato não apresentam mudanças significativas em sua caracterização morfo-elétrica com o tempo. Das experiências de SAXS a forma da função de densidade eletrônica $p(r)$ indicam que as nanopartículas apresentam uma forma esférica, com um raio médio de $\approx 17.0 \pm 2 \text{ nm}$ (Figura 21-A). A microscopia de transmissão eletrônica mostrado no gráfico $I(q)$ vs $q(\text{\AA})$ esta de acordo com este resultado, mostrando aglomerados de prata formando estruturas aproximadamente esférica com diâmetros de 36 nm . Observa-se no painel inferior de DLS (Figura 21.B) que essa reprodutibilidade medida da forma esférica para o estoque das, $[\text{AgNPs}] = 250.3 \mu\text{M}$, é acompanhado com diâmetros médios definidos de $41.7 \pm 0.8 \text{ nm}$, além da baixa dispersão com valor do índice de polidispersidade, PDI, estimado em 0.14 ± 0.01 sugerindo monodispersidade dos aglomerados de prata.

Outro parâmetro a ser considerado diz respeito a estabilidade dos clusters de *AgNPs*. As figuras 21-C e 21-D, são mostrados os espectro de absorção UV-Vis e o valor de potencial superfície zeta medidos para o estoque das *AgNPs*. Observa-se que as nanopartículas apresentam uma banda no intervalo entre 300 e 500 *nm* com forte absorbância em torno de 429 *nm*, que é característica das transições de níveis eletrônicos dos pontos Ag^0 para Ag^+ (Zhang et al., 2016). De acordo com esta informação e com o valor médio do potencial superfície zeta de -33.6 ± 0.7 *mV*, podemos demonstrar que o estoque apresenta agregados de átomos de prata com uma alta estabilidade coloidal (não agregação), atribuída à ligação superficial do citrato agindo como um revestimento de superfície estabilizador.

A caracterização morfo-elétrica de 10% Soro Fetal Bovino (SFB) em água ultra pura, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e 10% SFB em DMEM (proporção 1/10), todas essas soluções incubadas a 37°C por 24 e 48 horas de, foram caracterizadas através de experiências do diâmetro médio, potencial-zeta, absorbância UV-vis e SAXS.

4.1.2 Caracterização do soro fetal bovino (SFB)

Para 10% de SFB em água ultra pura apos 24 e 48 horas de incubação, o gráfico de diâmetro médio em função de intensidade (figura 22-A), mostra distribuições de tamanho multimodal de 1 a 1300 *nm*, com picos de intensidade máxima para partículas em torno de 51 e 300 *nm* e outros de intensidade menor a 5 e 1300 *nm*.

Os picos indicam uma distribuição de tamanho larga, compatível com o alto valor de PDI < 0.70 tanto para 24 e 48 h (ver Tabela 5), sugerindo uma distribuição poli-dispersiva de aglomerados moleculares. Este resultado é esperado para o SFB composto por proteínas de diferentes pesos moleculares e tamanhos como a albumina, globulina e hemoglobina. A principal componente proteica do SFB é a albumina, com 65 wt% em comparação com as outras proteínas (Waghmare, et al., 2018). Albumina tem peso molecular de 69 *kDa* e uma distribuição de tamanho bimodal (Sasidharan, et al 2015) que, em conjunto junto com as globulinas tipo α (151 *kDa*), β (15 *kDa*) e γ (150-380 *kDa*), assim como a hemoglobina (64.5 *kDa*), contribuem para a distribuição de tamanho multimodal (Aurica Precupas, et al., 2022; Rajendran e Prakash, 1993), conforme também mostrado em nossos resultados. A distribuição de carga superficial para o arranjo de 10% SFB, Figura 22-B, apresenta um potencial de superfície zeta negativo com baixo desvio padrão estimado em -13.9 ± 2.6 *mV* tanto para 24 e 48h de incubação (Tabela 5).

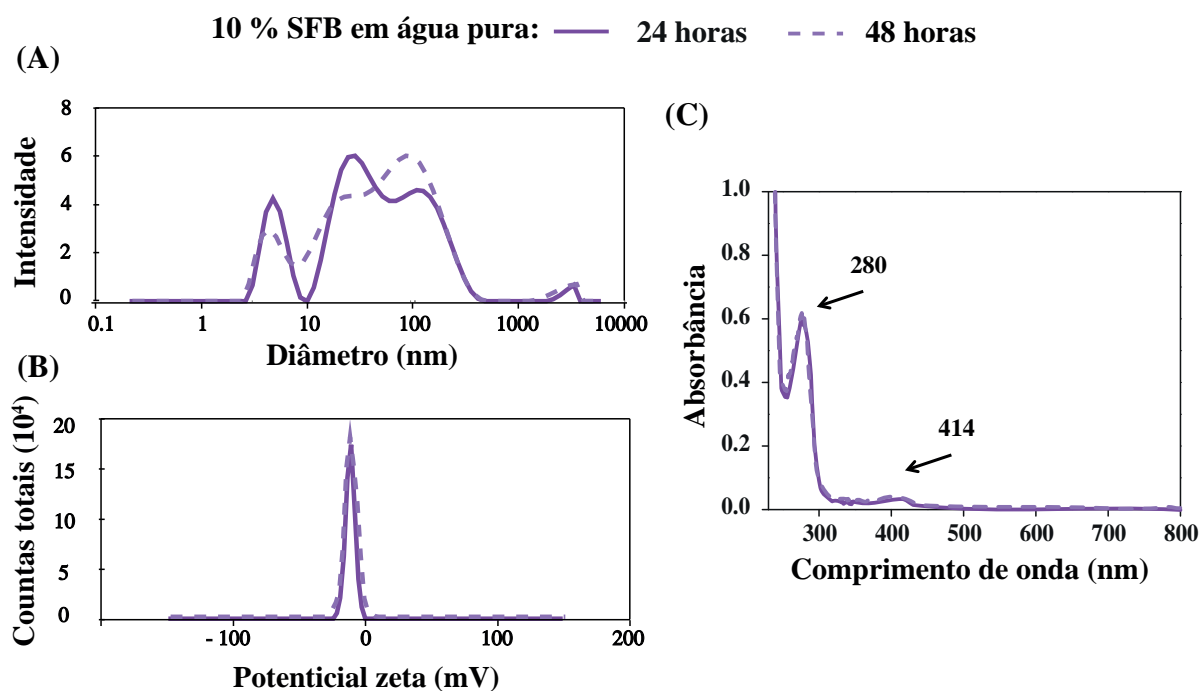


Figura 22: *Caracterização morfo-eléctrica para o soro fetal bovino (SFB) diluído em água ultra pura na proporção 1/10, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de DLS (A), potencial de superfície zeta (B) e absorção UV-vis (C).*

Potenciais de superfície zeta foram reportados para albumina e γ globulina em *PBS* com valores de -12.8 mV e $+5.5 \text{ mV}$ (Sasidharan, et al 2015). Por conseguinte, é provável que os outros grupos protéicos apresentem cargas superficiais negativas em seus componentes para neutralizar a carga da γ globulina. O espectro de absorção do SFB (10%) em 24 e 48 horas de incubação, mostrado na Figura 22-C, apresenta uma banda de absorção com um pico largo e de forte absorbância em torno de 280 nm característico da absorção UV-Vis dos resíduos intrínsecos de triptofano e tirosina presentes nas proteínas (Xiangrong, et al., 2021). Por outro lado, um pico de menor absorbância em torno de 414 nm é observado característico das porfirinas da hemoglobina (Bohemia, et al., 2016).

4.1.3 Caracterização de DMEM alta-glicose

Em contraste as caracterizações anteriores, os resultados encontrados para DMEM alta glicose puro, resumidos na Figura 23, indicam um padrão morfo elétrico distinto. No caso da morfologia, o diâmetro em função de intensidade (Figura 23-A), mostra um pico de intensidade máxima para partículas com diâmetros médios em torno de $0.31 \pm 0.03 \text{ nm}$ tanto para 24 e 48 h de incubação. Medidas de potencial zeta para o arranjo também foram

feitas, no entanto, os resultados não mostraram a existência efetiva de potencial superficial de carga. Através dos resultados pode-se dizer que os aminoácidos, sais inorgânicos e vitaminas presentes no DMEM, não interagem entre si para formar aglomerados, estando, muito provavelmente, distribuídos na água ultra pura como moléculas individuais. O espectro de absorção do DMEM, Figura 23-B, mostra bandas de absorção com um pico de absorbância em torno de 280 nm, característico do aminoácido triptofano, e dois picos menores centrados em 415 e 560 nm correspondentes a solução de vermelho fenol usado com indicador de pH (Li, et al., 2017).

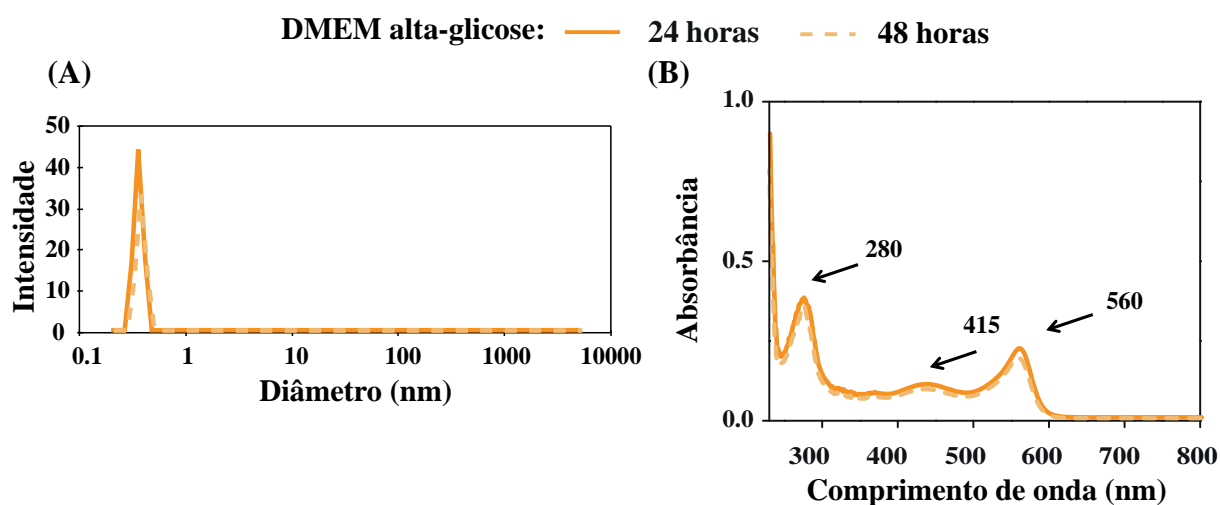


Figura 23: Caracterização morfo-elétrica para o meio de cultura celular (DMEM), após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de DLS (A) e absorção UV-vis (B).

4.1.4 Caracterização do meio de cultura suplementado (DMEM+10% SFB)

Os resultados de caracterização de 10% SFB em DMEM em relação aos encontrados para SFB em água ultra pura, indicam claramente que os componentes biomoleculares presentes no DMEM estão interagindo com o complexo proteico albumina/globulina/hemoglobina, mudando sua característica morfo-elétrica. Para 24 horas de incubação, foi observado um aumento nos diâmetros médios da distribuição de tamanho multimodal do arranjo albumina/globulina/hemoglobina. Foram observados valores de 10 e 56 nm para os picos de maior intensidade e em 365 e 1304 nm para os picos de menor intensidade em relação ao SFB em água conforme evidenciado pela Figura 24-A.

O valor calculado para PDI de 0.90 ± 0.02 , sugere uma distribuição poli-dispersiva de aglomerados. Adicionalmente, para 48 horas de incubação, pode-se ver que os valores

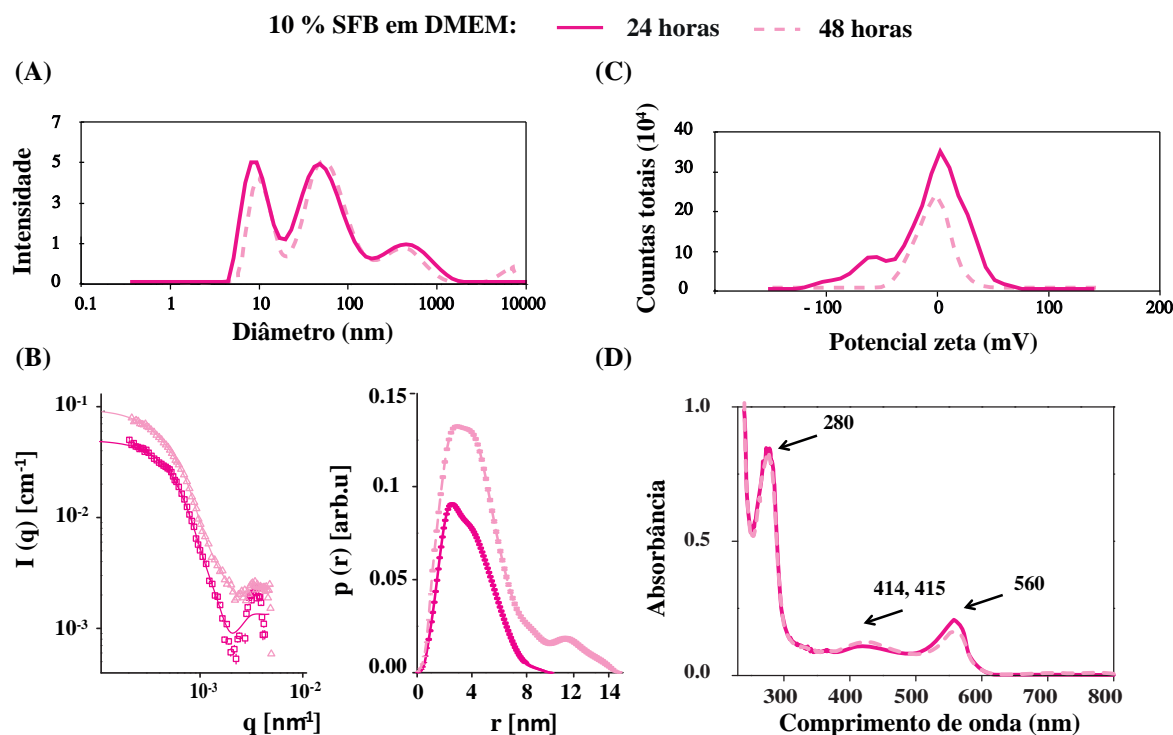


Figura 24: Caracterização morfo-elétrica para o soro fetal bovino (SFB) diluído em meio de cultura celular (DMEM) na proporção de 1/10, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C, obtida através de experiências de DLS (A), SAXS (B), potencial de superfície zeta (C) e absorção UV-vis (D).

de diâmetros médios apresentaram um aumento em relação a 24 horas. Este resultado é compatível com aqueles encontrados nas experiências de SAXS, onde a função de intensidade de espalhamento $I(q)$ e densidade eletrônica $p(r)$, Figura 24-B, indica claramente a evolução temporal de tamanhos e formas, com valores de raio variando de 3-10 nm para 24 h e de 4 para 15 nm para 48 h. Este resultado sugere uma interação dinâmica das biomoléculas de DMEM com complexo proteico albumina/globulina/hemoglobina.

A experiência de potencial zeta, Figura 24-C, mostra uma redução do potencial de superfície estimado em -6.37 ± 2.80 mV em relação ao SFB em água, entretanto, no tempo de incubação de 24 para 48 h, este potencial não apresentou mudanças. O espectro de absorção UV-vis, Figura 24-D, mostra a superposição de absorbâncias características do triptofano presentes nas proteínas do SFB e no DMEM em torno de 280 nm, além de também mostrar bandas de absorção correspondentes do vermelho fenol (560, 415 nm) e porfirinas da hemoglobina (414 nm). Em relação aos tempos de incubação, estes espectros não mostraram mudanças. Estes resultados, indicam que embora tenha-se uma evolução temporal nos tamanhos dos complexos proteicos/biomoléculas-DMEM, estes são estáveis

sem apresentar agregação.

Tabela 5: *Resumo dos principais resultados obtidos de caracterização para o estoque de AgNPs-Citrate (250.3 μM), soro fetal bovino (SFB), DMEM e 10% SFB diluído em DMEM, obtidos através de absorção Uv-vis, SAXS, DLS e zeta-potencial, após 24 e 48 horas de incubação.*

Amostras	Tempo de incubação				
	24 horas				
	UV-vis $\lambda(\text{nm})$	SAXS $r(\text{nm})$	DLS $D_z(\text{nm})$	PDI	Potencial Zeta $\zeta(\text{mV})$
AgNPs-citrate	429 ± 2	17.0 ± 2.0	41.7 ± 0.8	0.14 ± 0.01	-33.6 ± 0.7
SFB	280 ± 1		D.M	0.70 ± 0.40	-13.9 ± 2.6
DMEM	560 ± 2		0.31 ± 0.23	0.10 ± 0.01	n.i
10% SFB+DMEM	280 ± 2	3.0 ± 1.0	D.M	0.90 ± 0.02	-6.37 ± 2.80
48 horas					
AgNPs-citrate	430 ± 3	18.0 ± 1.0	41.0 ± 0.5	0.10 ± 0.02	-33.3 ± 0.33
SFB	280 ± 2		D.M	0.80 ± 0.10	-13.3 ± 1.3
DMEM	560 ± 1		0.32 ± 0.18	0.10 ± 0.01	n.i
10% SFB+DMEM	280 ± 2	4.0 ± 5.0	D.M	0.96 ± 0.03	-7.14 ± 0.30

PDI < 0.1 geralmente indica mono- dispersividade, enquanto os valores do PDI > 0.5 reflete distribuições polidispersas (Carrola et al. 2016). As abreviações D.M e n.i indicam distribuição multimodal e não identificado

4.1.5 Interação AgNPs - 10% SFB+DMEM e formação de coronas

Experiências para determinação do diâmetro médio, potencial-zeta, absorção UV-vis e SAXS, resumidos nas Figuras 25 e 26, tiveram por objetivo investigar a dinâmica de ligação molecular quando AgNPs-citrate (250.3 μM) são diluídas em 10% SFB+DMEM para se obter as concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM AgNPs posteriormente tratadas durante 24 e 48 horas na incubadora de células.

Nos gráficos da Figura 25-A, 24h à esquerda e 48h à direita, podemos mostrar que a região de 300 nm a 550 nm, o estoque de AgNPs-Citrate (linha preta) é responsável pela maior absorção de luz em relação a absorção do vermelho fenol e porfirinas do meio suplementado (linha rosa). Logo, nesta região, os resultados analisados refletem, basicamente, as absorbâncias das soluções de AgNPs com meio suplementado nas concentrações 25, 50, 75, 100 μM após 24 e 48 horas de incubação, além da própria solução estoque.

Com o aumento das concentrações de AgNPs (25, 50, 75 e 100 μM) das soluções, é possível verificar que estas apresentam bandas de absorção aproximadamente em torno de 431 nm, indicando que não ocorre um deslocamento hipsocrômico (deslocamento azul

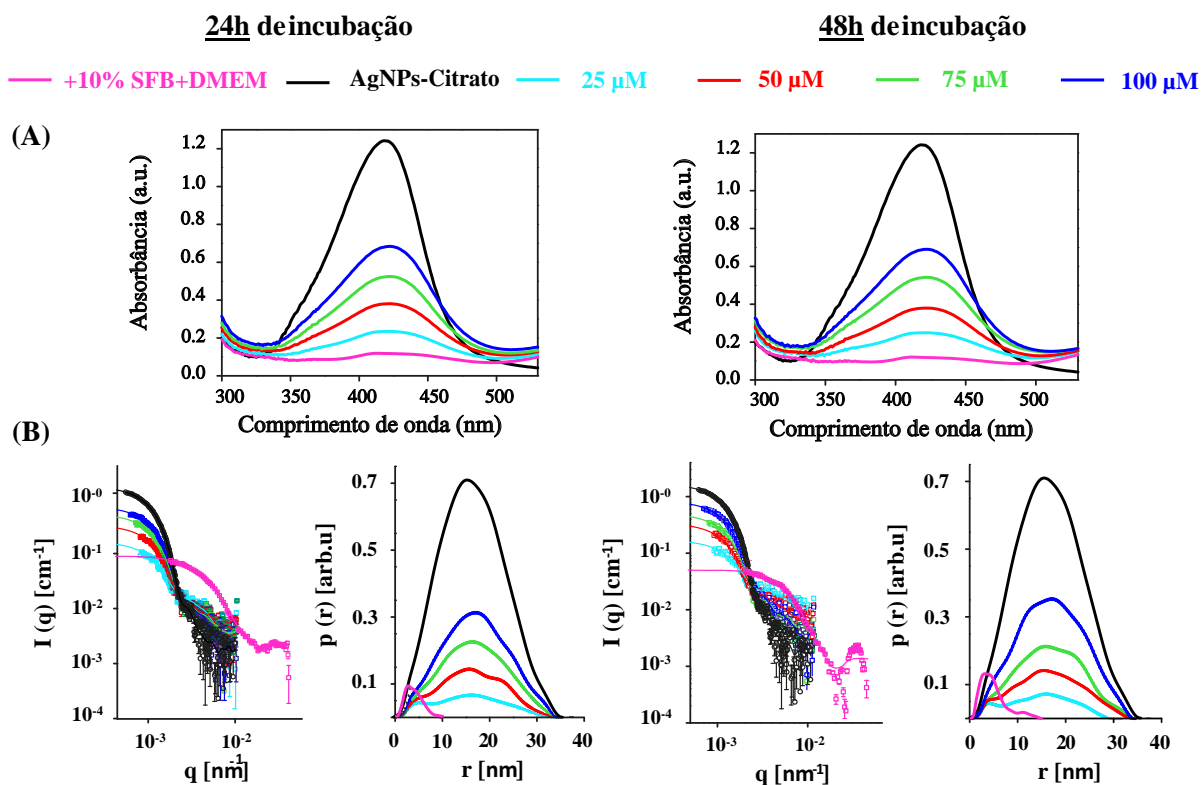


Figura 25: Resultados de absorção UV-vis (A) e SAXS (B) para AgNPs-Citrato diluído em meio de cultura celular (10% SFB em DMEM) para a obtenção das concentrações molar 25, 50, 75 e 100 μM de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C. As curvas para o estoque de AgNPs e DMEM suplementado com SFB também são mostrados nos mesmos gráficos para fins de comparação.

ou vermelho) da banda de absorção característica da nanopartícula em relação ao estoque (cor preta). A intensidade de absorvância do sistema nesta região aumenta com aumento da concentração de AgNPs, fato já esperado uma vez que há uma maior quantidade de nanopartículas de prata no meio de cultura absorvendo luz UV-Vis. Resultados de SAXS, apresentados na Figura 25-B, indicam o mesmo comportamento após 24 e 48 horas de incubação, com intensidades de espalhamentos $I(q)$ e bandas da função de densidade $p(r)$ para 25, 50, 75, e 100 μM similares em relação a banda do estoque AgNPs-citrato (curva preta), mostrando raios de $\approx 17\text{-}18\text{ nm}$ aparentemente estáveis (ver Tabela 6). Interessantemente, existe uma banda pequena de $p(r)$ ao redor de 5 nm tanto para 24 como 48 de incubação, que provavelmente tem sua origem no arranjo das proteínas albumina/globulina/hemoglobina característico do SFB (cor rosa) que, conforme aumentam as concentrações de AgNPs, a banda se torna menos aparente como é esperado devido à densidade eletrônica muito maior das AgNPs.

Nos gráficos da Figura 26-A, 24h à esquerda e 48h à direita, para as soluções

AgNPs-Citrato (cor preta) e SFB+DMEM (cor rosa), observa-se que o pico característico do diâmetro médio da AgNPs-Citrato (41 nm) apresenta maior intensidade em relação ao pico de intensidade máxima de SFB+DMEM em torno de 56 nm . Analisando os gráficos de diâmetro em função da intensidade para as soluções de AgNPs 25, 50, 75 e $100\text{ }\mu\text{M}$ após 24 e 48 horas de incubação (Figura 26 A da esquerda e direita), podemos ver uma distribuição de tamanho multimodal similar a de SFB+DMEM que vai desaparecendo à medida que a concentração de AgNPs vai aumentando para formar uma distribuição unimodal. O pico de maior intensidade que se desloca para valores de diâmetros maiores, conforme mostrado para as quatro concentrações molares, vai mascarando o padrão característico de distribuições de diâmetro das nanopartículas de prata.

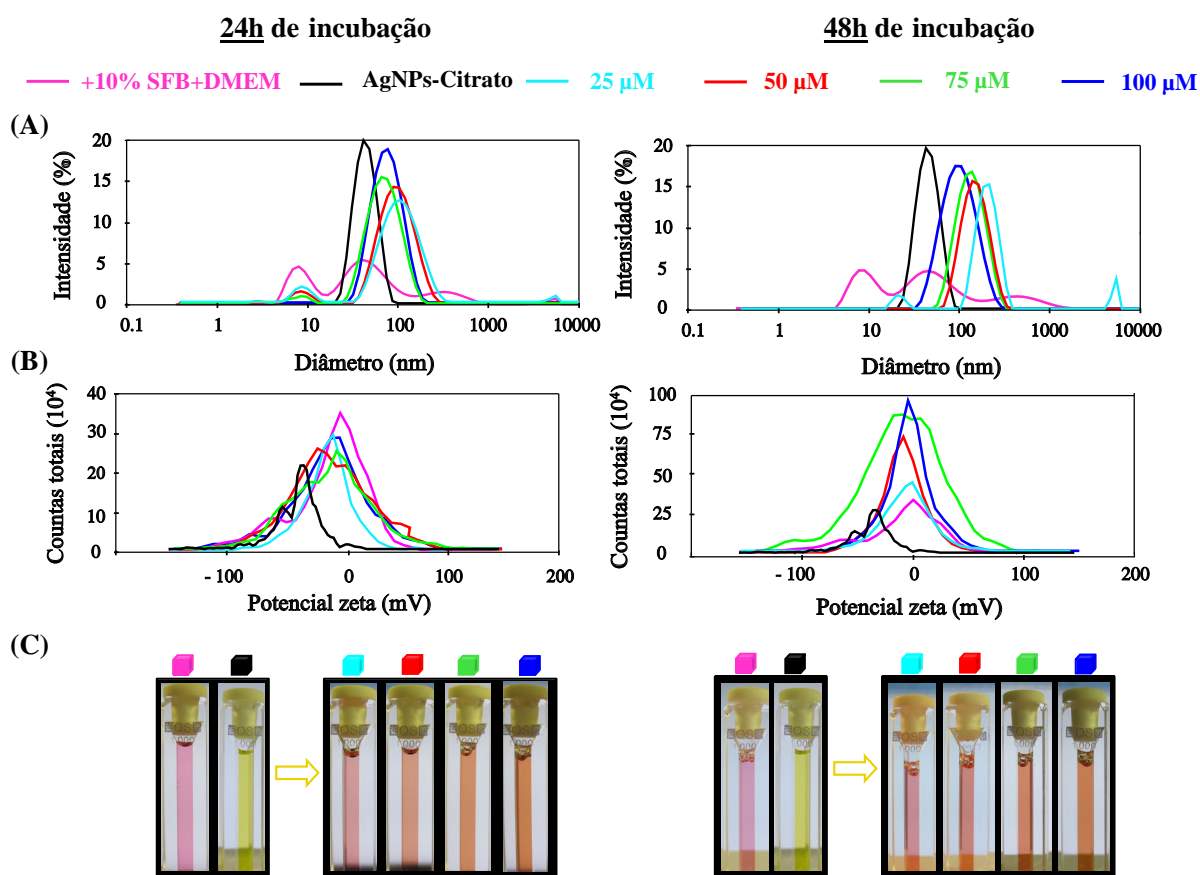


Figura 26: Resultados de DLS (A), potencial zeta (B), e imagens de turbidez (C) para AgNPs-Citrato diluído em meio de cultura celular (10% SFB em DMEM) para a obtenção da concentração molar de 25, 50, 75 e $100\text{ }\mu\text{M}$ de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação à temperatura de 37°C . Os valores para nanopartículas de estoque e DMEM suplementado também são mostrados nos mesmos gráficos para fins de comparação.

Analisando o comportamento das curvas após 24 horas de incubação, gráficos da Figura 26-A e Tabela 6, podemos ver que as concentrações de 25 e $50\text{ }\mu\text{M}$ indicam uma tendência de crescimento do diâmetro médio em comparação ao estoque de AgNPs-citrate,

resultando em valores de $90.8 \pm 11.0 \text{ nm}$ e $88.5 \pm 10.9 \text{ nm}$, além de índice de polidispersidade, PDI, estimado em $0,34 \pm 0,08$. As maiores concentrações, 75 e 100 μM , tiveram seus diâmetros médios (e desvio padrão) reduzidos, porém ainda maiores que *AgNPs* em citrato de sódio. O padrão de comportamento do diâmetro médio após 48 horas reproduz a tendência geral encontrada após 24 horas de incubação, onde os valores encontrados, partindo-se da menor concentração, foi $190,6 \pm 5,9 \text{ nm}$ para 25 μM , até o maior de $78,0 \pm 1,7 \text{ nm}$ para 100 μM , além do, PDI, estimado em $0,48 \pm 0,02$. Essa tendência de variação dos diâmetros médios em 48 horas quando contrastado com os tamanhos em 24 horas, mostra que o tempo de incubação é uma variável importante a ser considerada nas análises.

Os gráficos da Figura 26-B, 24h à esquerda e 48h à direita, mostram os resultados das medidas de potencial zeta para 25, 50, 75 e 100 μM após 24 e 48 horas de incubação. Os resultados mostram um perfil de potencial zeta diferente das misturas em comparação ao estoque de *AgNPs*-citrato (cor preta), mas similar com SFB-DMEM livre de nanopartículas (cor rosa), que se mantem à medida que a concentração de *AgNPs* aumenta. Podemos inferir a partir dos gráficos da Figura 26-B e Tabela 6, que os valores de potencial zeta para cada concentração de *AgNPs*, são similares ao SFB-DMEM em torno de $-5.4 \pm 2.8 \text{ mV}$, indicando que as componentes do meio de cultura influenciam nos resultados. Embora a estabilidade, ou coesão, das *AgNPs* não possa ser verificada pelas experiências do potencial de superfície zeta, imagens de turbidez para 25, 50, 75 e 100 μM após 24 e 48 horas de incubação, indicam visualmente não haver qualquer mudança no estado de agregação dos clusters de íons de prata (Figura 26-C).

Nossos resultados SAXS, espectroscopia de absorção UV-vis, DLZ e potencial de superfície zeta mostraram que o estoque de nanopartículas, isto é, aquelas diluídas em citrato de sódio e água ultra pura (*AgNPs*-Citrato), apresentam aglomerados (ou cluters) de prata, homoganeamente bem distribuídos, alta estabilidade e com uma distribuição de núcleos quase-esféricos de raio 41 nm .

A dispersão do estoque Citrato-*AgNPs* em 10% SFB+DMEM para a obtenção das diferentes concentrações molares de nanopartícula, 25, 50, 75 e 100 μM , revelam um comportamento interessante das propriedades morfo-elétricas dos agregados de prata. É sabido que experiências de absorção UV-vis e SAXS são técnicas muito úteis para as investigações dos mecanismos de formação e crescimento de nanopartículas (Mourdikoudis,

Tabela 6: *Resumo dos principais resultados obtidos de absorção Uv-vis, SAXS, DLS e potencial de superfície zeta para AgNPs-Citrato diluído em meio de cultura celular (10% SFB em DMEM) para a obtenção da concentração molar de 25, 50, 75 e 100 μM de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação.*

AgNPs (μM)	Tempo de incubação				
	24 horas				
	UV-vis $\lambda(\text{nm})$	SAXS $r(\text{nm})$	DLS $D_z(\text{nm})$	PDI	Potencial Zeta $\zeta(\text{mV})$
25	431 ± 2.0	13.1 ± 8.0	90.82 ± 11.05	0.34 ± 0.08	-6.70 ± 1.26
50	432 ± 3.0	13.4 ± 5.0	88.52 ± 19.93	0.26 ± 0.02	-7.30 ± 1.48
75	430 ± 4.0	13.8 ± 3.0	57.29 ± 1.25	0.28 ± 0.01	-5.98 ± 1.27
100	429 ± 2.0	13.0 ± 3.0	61.41 ± 1.20	0.24 ± 0.01	-6.26 ± 1.23
48 horas					
25	430 ± 4.0	12.4 ± 1.0	190.60 ± 5.86	0.48 ± 0.02	-1.83 ± 0.33
50	428 ± 3.0	13.6 ± 4.0	141.43 ± 2.00	0.25 ± 0.01	-3.37 ± 0.34
75	434 ± 2.0	13.7 ± 4.0	97.56 ± 1.58	0.16 ± 0.01	-4.68 ± 1.40
100	431 ± 3.0	13.0 ± 3.0	78.04 ± 1.74	0.12 ± 0.02	-3.44 ± 0.30

PDI < 0.1 geralmente indica mono- dispersividade, enquanto os valores do PDI na faixa 0.1 – 0.4 ou > 0.4 reflete distribuições de tamanho polidispersa moderada (Carrola et al. 2016).

et al. 2018). Por exemplo, Garcia et al. 2020 e Paramelle et al. 2014, demonstraram que o incremento no tamanho das nanopartículas está fortemente relacionado com um maior espalhamento ($I(q)$) e com mudanças de deslocamento da banda de absorbância maior conhecida como (*red-shiffting*). Os resultados SAXS e absorbância UV-vis relativos as concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM , mostraram que as funções $I(q)$ e $p(r)$ e as bandas de absorbância UV-vis máximas, não apresentaram mudanças significativas de maior espalhamento e de deslocamento (*red-shiffting*) em relação ao resultado encontrado para o estoque Cirtate-AgNPs. Este comportamento indica que os diâmetros das nanopartículas de prata permanecem monodispersos, mesmo após 24 e 48 horas de incubação em 10% SFB+DMEM.

Em contraste, resultados de DLS parecem indicar que o diâmetro hidrodinâmicos do núcleo das nanopartículas de prata, aumentaram após 24 e 48 horas de incubação nas soluções de AgNPs em meio de cultura suplementado nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM . As diferenças de tamanhos observados pelo SAXS e absorbância UV-vis em relação aos resultados de DLS após os períodos de incubação, não são necessariamente uma discordância entre os resultados, porém revelam o mecanismo de evolução do crescimento de uma nova bio-nanopartículas. O espalhamento de raios X a baixos ângulos e a espectroscopia de absorbância UV-vis relacionam o contraste gerado pela densidade eletrônica e

pelos elétrons de condução entre as nanopartículas e o meio de cultura suplementado (10% SFB+DMEM) (Li e Lee, 2016, Zhang et al., 2016). Portanto, como o contraste é muito maior para a prata do que para as proteínas albumina/globulina/hemoglobina presentes no meio de cultura suplementado, SAXS e absorvância UV-vis, detecta majoritariamente os diâmetros dos núcleos duros das nanopartículas de prata. O espalhamento de luz dinâmica (DLS) quantifica o coeficiente médio de difusão das partículas, isto é, quanto maior a partícula mais lenta sua difusão (Almatroudi, 2020). O aumento dos diâmetros hidrodinâmicos vistos no DLS em função da concentração é uma forte indicação que a adição do complexo proteico albumina/globulina/hemoglobina/biomoléculas-DMEM estabelece uma forte interação com as nanopartículas de prata (AgNPs-citrato) levando à formação de "coronas" constituídas por proteínas, aminoácidos, vitaminas e sais orgânicos ao redor das NPs, causando um aumento sistemático de seus respectivos tamanhos.

Estudos têm reportado (Neagu et al., 2017; Sasidharan et al., 2015) que a adsorção de moléculas biológicas podem causar alterações nas propriedades físico-químicas das nanopartículas, tais como tamanho, forma e estado de agregação e, portanto, altera sua interação com sistemas celulares *in vitro*. No entanto, para o sistema proteínas/DMEM/AgNPs-citrato, os dados de absorção UV-vis e SAXS demonstraram claramente que não há agregação e variação do diâmetro do núcleo dos clusters de íons de prata (*hard-core*) que permaneceu em 40 nm. A estrutura e composição das coronas depende do tempo de interação e da abundância dos componentes moleculares disponíveis (Hasen e Andreas, 2015). A partir dos resultados de DLS, verificou-se que o tamanho médio das estruturas coronas apresentou uma tendência de crescimento conforme decrescem as concentrações das soluções. Este resultado está de acordo com o volume de meio de cultura suplementado utilizado que foi maior para as baixas concentrações (25 e 50 μM) e menor para as altas (75 e 100 μM). Os resultados de DLS também revelaram que o tamanho médio das coronas cresce com o tempo de incubação para cada concentração de AgNPs. Essa tendência de aumentar os diâmetros médios em 48 horas quando comparada a 24 horas, pode estar relacionada com a maior adsorção de moléculas ao longo do tempo, podendo assumir que o tempo de incubação é uma variável importante a ser considerada para descrever o tamanho das coronas de material biológico.

Por outro lado, é interessante observar que tanto a adição de volumes maiores ou menores de meio de cultura suplementado aos agregados de prata para formar as soluções

(25 e 50 μM) e (75 e 100 μM), respectivamente, induziram mudanças no diâmetro médio enquanto o potencial de superfície zeta permaneceu praticamente constante e semelhante ao medido para 10% SFB+DMEM, sugerindo uma baixa estabilidade das estruturas coronas formadas. Imagens de turbidez e resultados das medidas de absorção UV-vis mostraram um efeito contrário com arranjos sem se agregarem e permanecendo estáveis, tanto para 24 e 48 horas de incubação. Uma explicação plausível poderia ser que o efeito de proporção entre as cargas presentes em [SFB+DMEM/AgNPs-citrate], tal que SFB+DMEM apresenta uma maior quantidade de cargas em relação ao AgNPs-citrate que é capaz de blindar completamente a superfície externa de cargas negativas da NPs. Este efeito de blindagem é praticamente constante com o tempo conforme mostrou o comportamento do potencial zeta em ambos os períodos de incubação.

A fim de investigar a interação e adsorção entre as biomoléculas do soro fetal bovino (SFB) e do meio de cultura (DMEM), compostas basicamente de proteínas, aminoácidos e vitaminas, com as nanopartículas de prata, foram preparadas soluções separadas de SFB e DMEM para formar as concentrações 25, 50, 75 e 100 μM com *AgNPs*, posteriormente incubadas por 24 e 48 horas (ver Figura suplementar em anexo 5). A observação geral mais relevante obtida a partir dos resultados de DLS, potencial zeta, absorção UV-vis e imagens de turbidez estabelece que a adição de SFB nas concentrações testadas não mostraram a adsorção de proteínas na superfície da nanopartícula para formar a nova identidade biológica (formação de coronas), enquanto, independentemente da composição química das moléculas, o DMEM desencadeou aglomeração rápida e irreversível com *AgNPs*. Interessantemente, os resultados tanto para baixas como altas concentrações da diluição das nanopartículas de prata com 10% SFB+DMEM, mostraram a formação de coronas estáveis com o tempo. Ligantes estabilizantes hidrofílicos para nanopartículas são preferidos no uso terapêutico por sua alta solubilidade em água (Fratoddi, 2018). No entanto, grupos de estudo têm reportado que a superfície hidrofílica dos ligantes como, por exemplo, o citrato utilizado neste trabalho, pode levar à formação de camadas de água ao redor das partículas, o que as tornaria mais inacessíveis para moléculas como proteínas (Stonnik et al., 1995). De fato, Sasidharan et al., 2015, mostraram uma forte interação entre a albumina humana e o ácido lipóico, ao invés do citrato utilizado na estabilização das AgNPs. Em contrapartida, foi postulado que a excessiva adsorção de moléculas biológicas na superfícies das nanopartículas pode mudar a estabilidade coloidal

para formar sistemas que apresentam tendências de agregação, conforme relatado para o caso do fibrinogênio revestido com nanotubos de carbono, nanopartículas de prata e ouro com grande quantidade de carga positiva na sua superfície (De Paoli, et al. 2014) (Abhilash, et al. 2015; Huang, et al., 2016). Este resultado nos sugere que as moléculas carregadas positivamente no DMEM (sais inorgânicos, vitaminas ou aminoácidos) estão interagindo eletrostaticamente com a superfície negativa das *AgNPs* gerando atração entre elas, e mudando a estabilidade coloidal do arranjo para um sistema que apresenta tendências para agregação. Trabalhos têm mostrado que ligantes hidrofílicos, como o citrato, perdem a condição de absorver água em condições com altas concentrações de sais (Florin, et al 1984) como aquelas encontradas no DMEM devido a presença dos sais inorgânicos de sua composição. Adicionalmente, (Gonzales-Garcia, et al 2022), têm mostrado que os diferentes ligantes químicos nas superfícies das coronas proteicas, influenciam significativamente em sua composição. Portanto, é possível supor que na situação onde a solução 10% SFB+DMEM é utilizada como solvente, as primeiras moléculas a se aderirem às superfícies das *AgNPs*, formando uma superfície química carregada positivamente, são possivelmente os diferentes sais inorgânicos presentes no DMEM. Em seguida, esta nova camada absorve as diferentes proteínas do soro fetal bovino e os aminoácidos encontrados no DMEM através de interações de origem coulombianas ou hidrofóbicas.

A albumina é a proteína em maior quantidade encontrada no SFB (aproximadamente 65% da composição proteica total) e pode se ligar reversivelmente a diversos ligantes (Moman et al. 2022). De fato, estudos têm mostrado que em conjunto com a γ globulina, hemoglobina e outras proteínas de baixo peso molecular, ela apresenta a maior quantidade de adsorção na superfície de nanopartículas para formar a corona molecular (Gonzales-Garcia, et al 2022, Xiangrong, et al., 2021, Li, et al., 2017). Comparando os resultados DLS e SAXS de nosso trabalho, pode-se estimar a espessura da corona rica em moléculas biológicas ao redor das nanopartículas, uma vez que o complexo *AgNPs*-citrato mantém o mesmo tamanho médio durante todo o processo de formação das coronas. Podemos estimar essa espessura à partir da diferença entre os valores de raios hidrodinâmicos ($R_{[Hd-AgNPs]}$) (Tabela 6) e ($R_{[AgNPs-citrato]}$)(Tabela 5), segundo a equação (4.1)

$$\Delta R_{corona} = R_{[Hd-AgNPs]} - R_{[AgNPs-citrato]} \quad (4.1)$$

Estas camadas biomoleculares apresentam uma redução em seus respectivos valores

de espessura conforme aumentam-se as concentrações de *AgNPs*, de 49.1 ± 6.3 até 15.6 ± 4.6 nm para 24 horas, e de 148.9 ± 5.9 até 36.3 ± 2.5 nm para 48 horas de incubação (ver tabela 7).

Tabela 7: Valores de espessura da corona rica em moléculas biológicas obtidos para 25, 50, 75 e 100 μM de *AgNPs*, após 24 e 48 horas de incubação.

AgNPs (μM)	Tempo de incubação	
	24 horas	48 horas
	$\Delta R_{corona}(nm)$	$\Delta R_{corona}(nm)$
25	49.1 ± 6.3	148.9 ± 5.9
50	46.8 ± 2.1	99.7 ± 4.1
75	15.6 ± 4.6	$55.9.2 \pm 3.5$
100	19.7 ± 3.9	36.3 ± 2.5

A corona de ligação forte (*hard corona*) é a primeira camada que se estabelece firmemente, e ligada quase que irreversivelmente, entre as *AgNPs* e às biomoléculas. De fato Lundqvist, et al. 2008 têm demonstrado que a *hard corona* repousa fortemente ligada à superfície das nanopartículas por mais tempo. Sobre a corona dura, encontram-se as camadas macias (*soft corona*) que também são compostas por outras biomoléculas que apresentam mudanças dinâmicas no tempo (Pearson, et al. 2014). Possivelmente, este aumento na espessura das coronas entre 24 e 48 horas de incubação para cada concentração de nanopartículas (25, 50, 75 e 100 μM de *AgNPs*), esteja associada com essas moléculas que formam essas camadas mais macias.

Apesar destes resultados importantes sobre a caracterização das *AgNPs* e formação das coronas, recentes estudos têm reportado que as *AgNPs* podem induzir alterações conformacionais na estrutura secundária e terciária das biomoléculas que são adsorvidas em sua superfície (Jaiswal et al., 2020), revelando que tais modificações podem causar redução na internalização das *AgNPs* pelas células. Por exemplo, Yan et al. 2013 mostraram que a interação entre nanopartículas de polímero e o SFB, resultou na completa desnaturação da albumina do soro causando redução de eficiência na internalização das *AgNPs* para dentro das células monocíticas. Também é importante mencionar que estas mudanças nas estruturas das biomoléculas poderia causar morte celular por desnutrição uma vez que neste trabalho utilizamos DMEM suplementado com 10% de SFB.

Uma vez que alterações nas propriedades morfo-elétricas das *AgNPs* bem como mudanças na disposição espacial das biomoléculas em torno destas, levando a formação

das estruturas coronas, são importantes para a interação destas entidades com as células, experiências de espectroscopia de absorção UV-vis, fluorescência estática e resolvida no tempo foram empregadas para estudar essas estruturas em maiores detalhes. No entanto, é importante mencionar que os resultados adicionais gerados neste projeto de Doutorado, não fazem parte desta tese, porém serão apresentados num terceiro artigo. A priori, os resultados não mostraram mudanças estruturais significativas nas componentes adsorvidas na superfície das nanopartículas. Nesse sentido, introduzimos o conceito de um nano transportador de coronas baseado na interação AgNPs-citrato com biomoléculas não tóxicas usadas no crescimento celular, isto é, a solução 10% SFB+DMEM, as quais se mostraram altamente compatíveis no sentido de não modificar a forma, tamanho, composição ou estado de agregação do núcleo das nanopartículas, tanto para 24 e 48 horas de exposição nas diferentes concentrações testadas. Além disso, as coronas formadas apresentaram uma alta estabilidade sem agregação entre elas com o tempo, embora tenham aumentado o diâmetro hidrodinâmico em cada concentração.

Na seção seguinte são apresentados resultados da absorção celular dos complexos corona biomolecular (AgNPs-citrato/10% SFB+DMEM) pelas células que participam na regeneração e reparação tecidual como os fibroblastos (FN1), as células endoteliais de cordão umbilical (HUV-EC-C) e os macrófagos (RAW 264.7), nas doses de 25, 50, 75, 100, and 185 μM , incubadas durante intervalos de tempo previamente determinados. Nosso objetivo é demonstrar que a citotoxicidade inerente das *AgNPs* complexadas (coronas biológicas) pode ser utilizada para controlar a taxa de eventos celulares desencadeados durante o processo de cicatrização de feridas cutâneas e, para tanto, é imperativo uma compreensão básica sobre o crescimento celular e os eventos metabólicos associados a exposição pela prata, estes últimos, descritos por meio de vias metabólicas específicas de maneira qualitativa (identificação das vias) e quantitativa (percentuais de variação dos metabólitos envolvidos em cada via).

4.2 Estudo de viabilidade celular com Bio-AgNPs

Nesta seção, apresentamos os resultados dos ensaios citotóxicos padronizados efetuados sobre as três linhagens de células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7, tratadas com as nanopartículas de prata. As células foram expostas a um conjunto planejado de doses AgNPs em 10% SFB+DMEM durante diferentes tempos de incubação e os efeitos de crescimento celular e de citotoxicidade foram avaliados. Com base nesses primeiros ensaios exploratórios, informações relevantes sobre os intervalos de concentrações molar das AgNPs e tempos de incubação foram obtidos e usados para estabelecer o conjunto de condições otimizadas para os experimentos de RMN para estudar, de maneira mais direcionada, as principais alterações metabólicas desencadeadas pelo tratamento das nanopartículas em cada linhagem.

4.2.1 Experiências de cinética de crescimento celular (CDC)

O crescimento celular é definido como o aumento coordenado de todos os constituintes celulares. Durante esta fase, na qual nutrientes essenciais devem estar presentes, as células dividem-se e a população cresce com uma taxa específica de crescimento máxima (τ) (Durán et al. 2014). Após a fase de crescimento celular, ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular (morte celular). Isso origina um decréscimo na concentração de células viáveis da população ao longo do tempo. Durante essa fase, ocorre um declínio da taxa específica máxima de crescimento (τ) (Singh, 2015). A seguir, apresentamos as curvas de crescimento das células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 na ausência e presença das AgNPs.

Como pode ser visto na Figura 27, resultados de CDC obtidas através da contagem em câmara de Neubauer, foram organizados por concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 185 μM) e mostrados em painéis separados. Cada painel contém todas as linhagens diferenciadas por símbolos (círculos vermelhos, quadrados verdes e diamantes azuis) e tempos de incubação por 24, 48, 72 e 96 horas para otimizar a apresentação dos resultados. A partir das análises destes painéis, podemos ter um primeiro vislumbre de como a citotoxicidade das *AgNPs* afeta o tempo de vida regular das células não tratadas, permitindo-nos estimar as taxas de proliferação, ou τ (s^{-1}) (Durán et al. 2014).

Analisando o comportamento das curvas apresentadas na Figura 27, na ausência

de nanopartículas ($0 \mu\text{M}$), verifica-se que as linhagens FN1 e HUV-EC-C apresentam comportamento similar de proliferação até 48 horas, seguido por uma clara redução na população de células que pode ser associada com o esgotamento dos nutrientes do meio de cultura e pelo processo natural de morte celular por competição de espaço ou acúmulo de metabólitos citotóxicos. Por outro lado, para a linhagem RAW 264.7, o máximo parece ocorrer mais tarde, em aproximadamente 72 horas e, em seguida, começa a decrescer pelas mesmas razões descritas anteriormente.

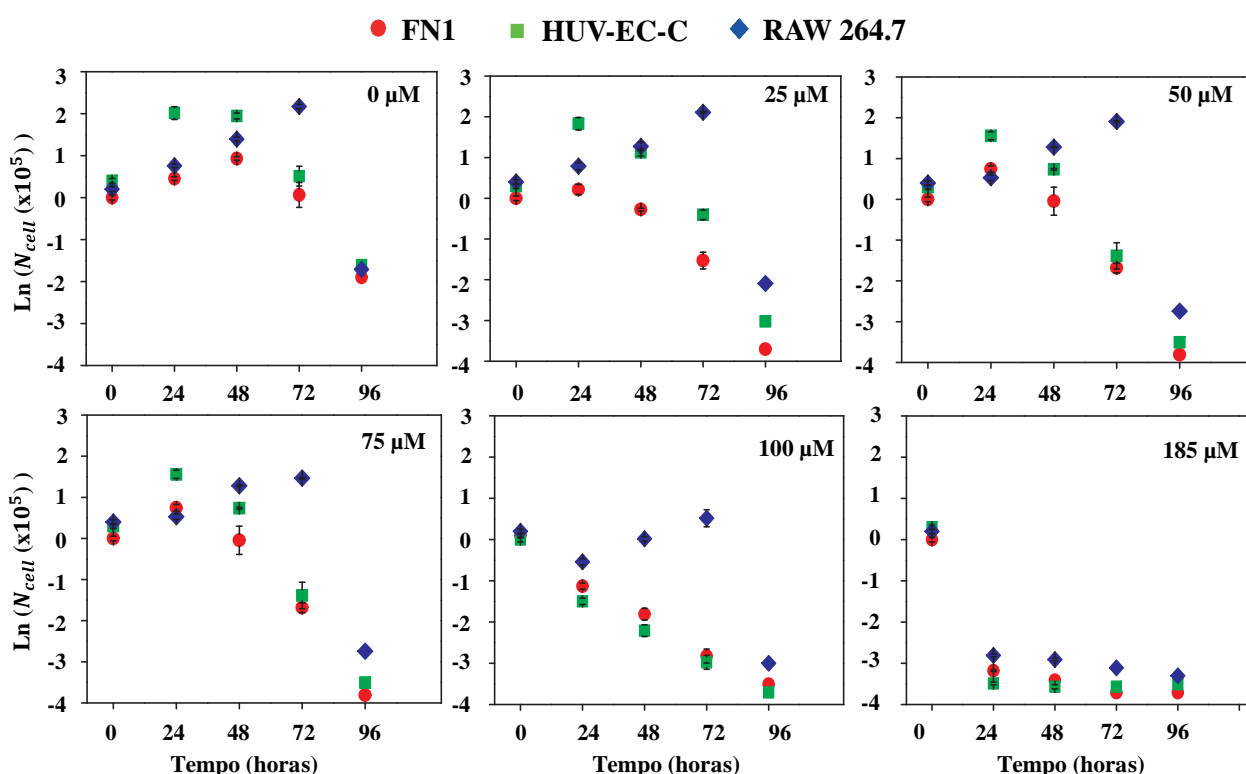


Figura 27: Curva de crescimento celular, obtido através da contagem de Neubauer, para células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 na ausência e presença de concentrações de AgNPs com um tempo de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas.

A fim de considerar apenas os efeitos da morte induzidos pela citotoxicidade das nanopartículas de prata, a região de mortalidade natural das células foi separada das análises posteriores. Portanto, a análise de citotoxicidade para FN1 e HUVEC será considerada para tempos ≤ 48 horas e, para células RAW 264.7, tempos ≤ 72 horas. Assumida esta condição, podemos ajustar as curvas dependentes do tempo e, assim, estimar as taxas de expansão ($\tau > 0$) e redução ($\tau < 0$) das populações de células em função da concentração molar, permitindo-nos definir faixas de citotoxicidade AgNPs.

O comportamento dos dados na Figura 27 revela ainda que quando as nano-

partículas de prata nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 185 μM são administradas, as respostas citotóxicas mostradas por FN1 e HUV-E-C nas primeiras 48 horas, onde as células estão se expandindo naturalmente, indica uma diminuição contínua nas taxas de expansão e uma tendência crescente de morte celular. Conforme mostrado na Tabela 8, as células da linhagem FN1 apresentam valores negativos para as taxas já da primeira concentração de $[\text{AgNPs}] = 25 \mu\text{M}$, enquanto o HUV-EC-C mostra os mesmos valores negativos para $[\text{AgNPs}] > 50 \mu\text{M}$, demonstrando uma sensibilidade menor aos efeitos citotóxicos das AgNPs quando comparada a FN1. De fato, as células HUV-EC-C mostraram citotoxicidade pronunciada em concentrações superiores a 75 μM , especialmente acima de 100 μM onde ambas as células FN1 e HUV-EC-C apresentaram comportamentos semelhantes.

Tabela 8: Valores das taxas de proliferação, ou τ (s^{-1}), para as linhagens celulares na ausência e presença de concentrações de AgNPs com um tempo de incubação de 0-48 para FN1, HUV-EC-C e, 0-72 horas para RAW 264.7.

AgNPs (μM)	Tempo de incubação		
	FN1 (0-48 horas) $\tau(s^{-1})$	HUV-EC-C (0-48 horas) $\tau(s^{-1})$	RAW 264.7 (0-72 horas) $\tau(s^{-1})$
0	0.019 ± 0.003	0.047 ± 0.003	0.029 ± 0.001
25	-0.058 ± 0.005	0.023 ± 0.004	0.028 ± 0.003
50	-0.060 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.026 ± 0.001
75	-0.045 ± 0.001	-0.046 ± 0.005	0.020 ± 0.001
100	-0.042 ± 0.001	-0.033 ± 0.001	0.015 ± 0.002
185	-0.025 ± 0.003	-0.023 ± 0.002	-0.027 ± 0.003

A mesma resposta citotóxica não ocorre para o caso dos macrófagos RAW 264.7 onde, somente após as primeiras 72 horas do intervalo de $25 \leq [\text{AgNPs}] \leq 100 \mu\text{M}$, as células tenderam a apresentar uma redução nas taxas de expansão com o aumento da concentração de AgNPs, mostrando sempre valores positivos de τ com 0.028, 0.026, 0.020, e $0.015 s^{-1}$, até tornarem-se negativos apenas para $[\text{AgNPs}] \geq 185 \mu\text{M}$ (Tabela 8). Este comportamento sugere que as células RAW 264.7 tem uma maior tolerância às nanopartículas de prata durante os períodos de incubação testados, demonstrando que esta linhagem é mais resiliente aos efeitos citotóxicos que as linhagens FN1 e HUV-EC-C. O conjunto destes resultados mostra que o potencial genético da célula é um ponto importante a ser levado em consideração, já que a composição da biomolécula-AgNPs (seção 4.1.5) e as condições do crescimento foram as mesmas para às três linhagens celulares. Este resultado é consistente com os resultados de Pratsinis et al. 2006, que observaram

um efeito citotóxico depois de 72 horas de incubação dos macrófagos com nanopartículas de prata em baixas concentrações.

Finalmente, para concluir esta sub-seção, embora os macrófagos RAW 264.7 estejam se expandindo até 72 horas de incubação, optamos por não utilizar este tempo na análise dos estudos, devido a questões relativas aos critérios experimentais adotados neste trabalho.

4.2.2 Análise de Morfologia e área Celular

O estudo para avaliar as alterações morfológicas nas células FN1, HUV-E-C e RAW 264.7, foram realizados através um conjunto representativo de imagens microscópicas coletadas após a exposição das células a 25, 50, 75 e 100 μM de AgNPs por 24 e 48 horas de incubação. Assumimos que as células foram caracterizadas individualmente como discos cujos diâmetros foram obtidos através de um microscópio e escalímetro, tomando até 10 células por grupo. A partir desses valores, as áreas celulares superficiais em μm^2 foram calculadas em função das doses e tempo.

A partir das imagens microscópicas mostradas na Figura 28-A, quando as linhagens celulares FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 são expostas a diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 horas, podemos ver que as células se desprendem do substrato e ocorre a formação de corpos apoptóticos a medida que a concentração das AgNPs aumenta, indicando que o efeito citotóxico das nanopartículas está impactando sobre o metabolismo celular normal ou basal das células. Adicionalmente, da Figura 28-B, pode-se ver que, em média, os valores das áreas celulares superficiais calculado para as linhagens FN1 e HUV-EC-C, tendem a decrescer em função da concentração e do tempo. Por outro lado, esses valores obtidos para a linhagem RAW 264.7, tendem a apresentar um ligeiro aumento quando a concentração de AgNPs e o tempo de tratamento, aumenta. Conforme sumarizado na Figura 28, os intervalos de concentração de AgNPs onde as mudanças morfológicas e da área celular ocorrem são diferentes entre as linhagens celulares, mostrando que cada uma delas apresenta resiliência celular característica contra os efeitos citotóxicos das AgNPs, resultado que está de acordo com aqueles obtidos anteriormente dos ensaios de CDC. Portanto, a definição de regiões de baixa e alta toxicidade para cada linhagem de célula é relevante para estes estudos.

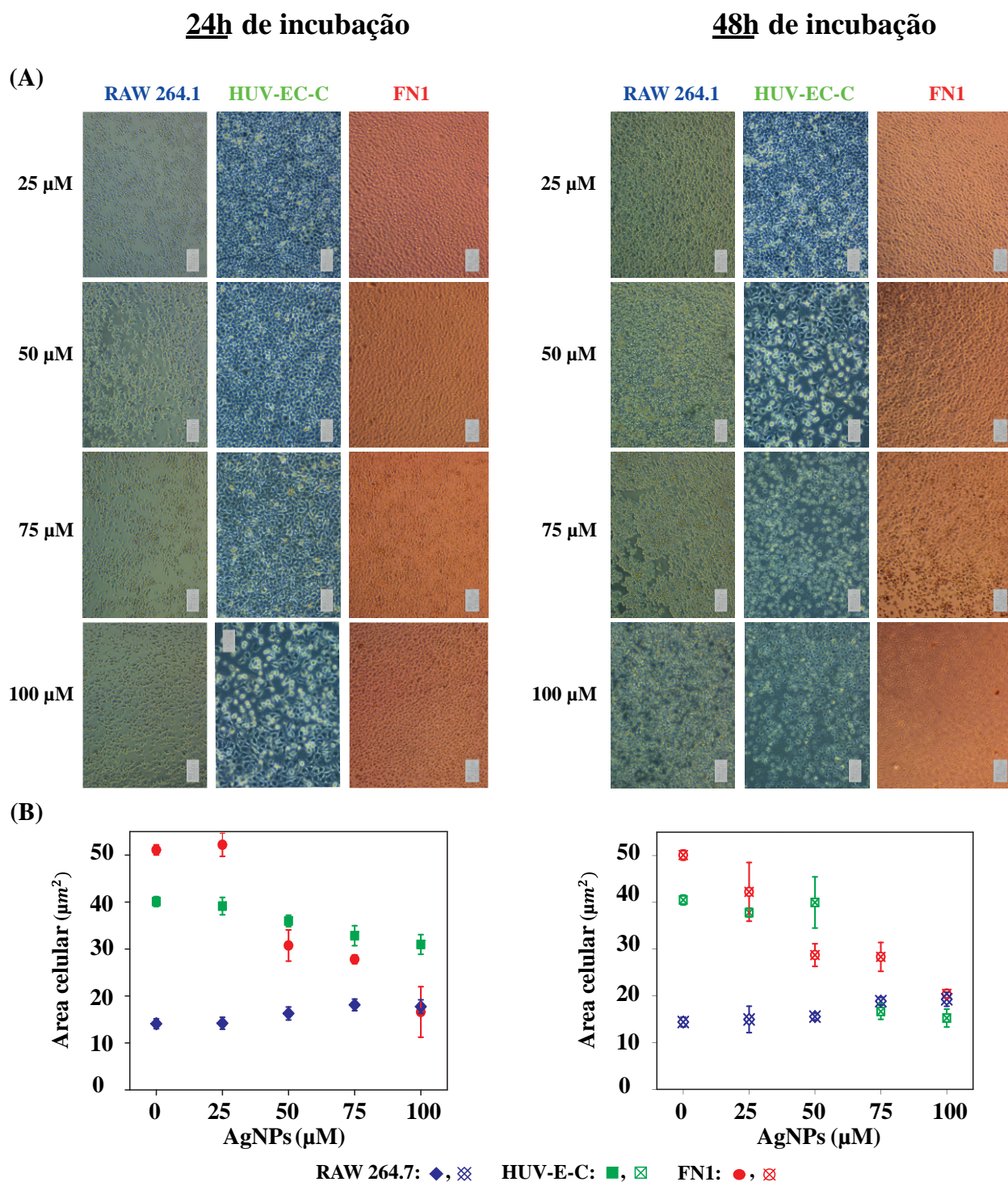


Figura 28: (A) Microscopias ópticas mostrando os aspectos morfológicos das linhagens celulares RAW 264.7, HUV-EC-C e FN1, após a exposição com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 horas de incubação (painéis superiores esquerdo e direito); (B) Valores médios de área celular em função de concentrações molares e tempos de exposição para as linhagens RAW 264,7 (diamantes azuis), HUV-EC-C (quadrados verdes) e FN1 (círculos vermelhos). As fotos microscopias foram obtidas em um microscópio invertido Leica MC170HD com ampliação $\times 10$.

4.2.3 Efeito de citotoxicidade dependente dose-resposta induzida por bio-AgNPs

Os efeitos citotóxicos induzidos pelas nanopartículas de prata sobre as linhagens celulares FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 após a exposição por 24 e 48 horas sob incubação, foram avaliados através de ensaios envolvendo contagem celular em câmara de Neubauer e MTT que geraram resultados importantes sobre as taxas de proliferação e a atividade metabólica celular. A análise dos resultados obtidos proporcionaram ainda o cálculo da concentração efetiva de nanopartícula (EC50) capaz de matar 50% de células para cada linhagem, que colaborou com a definição das regiões de baixa e alta toxicidade, respectivamente, denominadas como doses sub-letais e letais.

Analisando os gráficos de “ N_{cells} x AgNPs” e “absorbância x AgNPs” com 24 e 48 horas de incubação celular, resumidos nos resultados dos ensaios de câmara Neubauer e MTT (Figura 29-A e 29-B), podemos ver que as linhagens celulares RAW 264.7, HUV-EC-C e FN1, apresentam comportamentos semelhantes para as curvas de dose-resposta descritas em termos das células viáveis. À medida que a concentração de AgNPs aumenta no meio de cultura, observamos uma diminuição sistemática na população de células viáveis através do decréscimo dos valores de N_{cells} (Figura 29-A) e da absorbância (Figura 29-B). A determinação da porcentagem de decréscimo na população celular para cada concentração em relação ao controle (ausência de nanopartículas), assim como a obtenção da concentração efetiva, EC50, foram obtidas a partir das curvas de “ N_{cells} x AgNPs” e da “absorbância x AgNPs” (ver Tabela 9 e 10). Para obtenção dos valores de EC50 para cada linhagem, foi utilizado o método de regressão logística das curvas de MTT. Para o caso das células da linhagem FN1, os valores de EC50 foram 78.5 ± 3.0 e $50.0 \pm 1.7 \mu\text{M}$ para 24 e 48 horas, respectivamente, resultando numa porcentagem de decréscimo na população celular (N_{cells}) de aproximadamente 46-56% em comparação ao caso controle ao considerarmos ambos os tempos de incubação (ver Tabela 9 e 10). Entretanto, as células da linhagem HUV-EC-C apresentaram EC50 de 60.0 ± 4.0 e $49.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$ para 24 e 48 horas, respectivamente, reduzindo o número de células viáveis N_{cells} entre 47-57% em relação ao controle (ver Tabela 9 e 10). Os valores de EC50 calculados para células da linhagem RAW 264.7 foram 72.9 ± 5.2 e $53.5 \pm 3.7 \mu\text{M}$, apresentando uma diminuição de aproximadamente 45% na proliferação celular em comparação com o RAW 264.7 na ausência de AgNPs para ambos os tempos de incubação (ver Tabela 9 e 10). Por

outro lado, podemos observar uma tendência geral de $EC50_{24h} > EC50_{48h}$, confirmando novamente a dependência do tempo e, portanto, sustentando a premissa já observada nos ensaios de câmara Neubauer (Figura 29-A) de que ambos os mecanismos citotóxicos estão presentes.

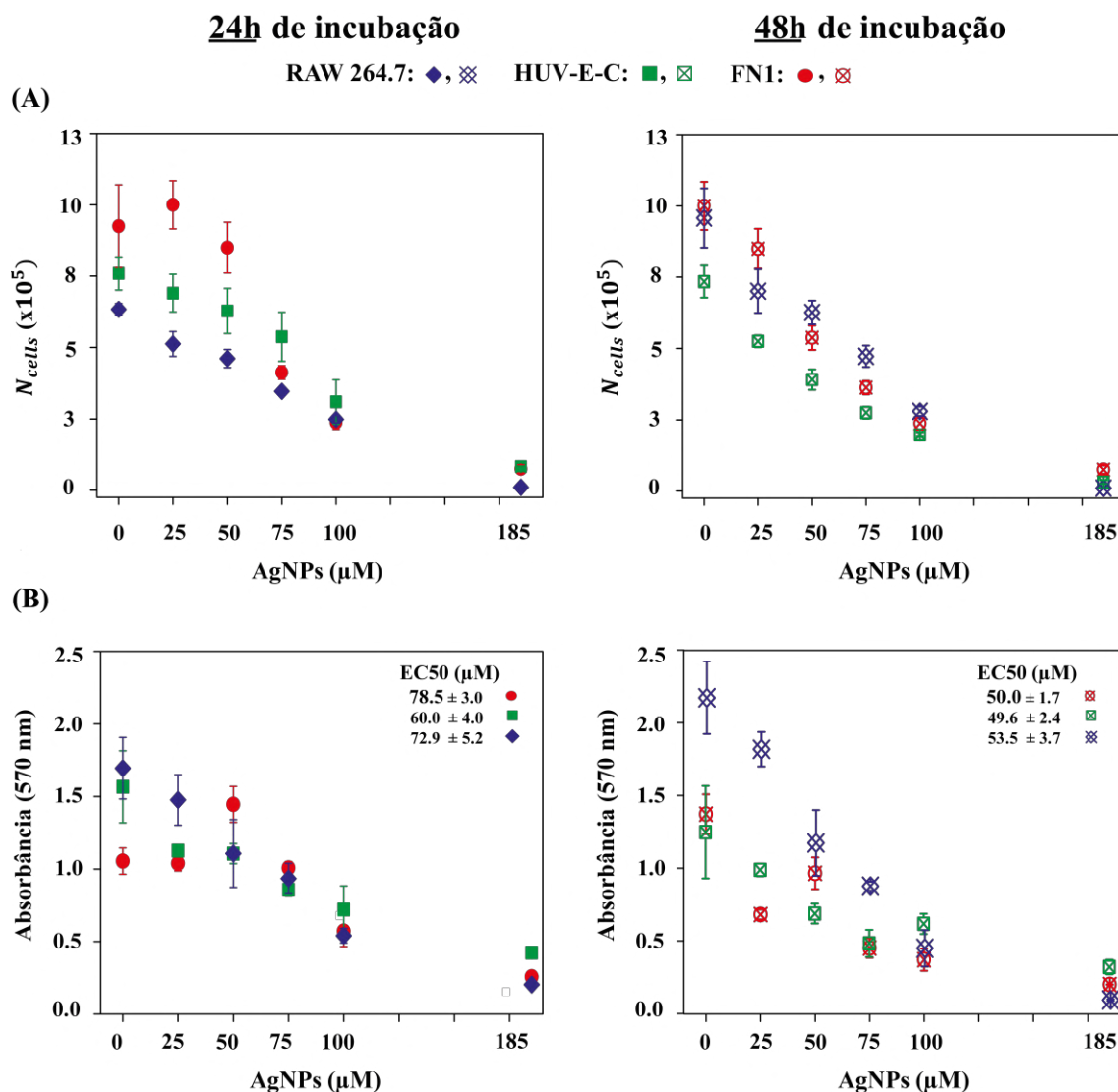


Figura 29: O número de células viáveis contadas através de ensaios (A) câmara de Neubauer e (B) MTT são mostradas em função das concentrações molares de AgNPs para as linhagens RAW 264,7(diamantes azuis), HUV-EC-C (quadrados verdes) e FN1 (círculos vermelhos) por 24 e 48 h de exposição. Os parâmetros $EC50$ também foram incluídos neste gráfico.

Com base nos resultados de $EC50$ e das porcentagens de decréscimo celular, foram definidas as zonas de baixa e alta toxicidade (ou letalidade). A primeira zona ou região, chamada sub-letal, foi definida uniformemente para as três linhagens celulares como aquela em que as concentrações de $[AgNPs] < 75 \mu M$ em 24 horas e $[AgNPs] < 50$

μM em 48 horas, resultando em uma diminuição média das populações celulares entre 5 a 40% em relação ao controle (ver Tabela 9 e 10).

Tabela 9: *Resumo dos parâmetros morfológicos calculados para as bio-AgNPs e linhagens celulares a partir das análises de caracterização morfo-elétrica e viabilidade celular, em função da concentração após 24 horas de incubação do arranjo.*

Linhagem	AgNPs (μM)	Tempo de incubação						
		24 horas						
		N_{AgNPs} ($\times 10^{10}$)	V_{AgNPs} ($\times 10^{-3} \mu\text{m}^3$)	N_{cell} ($\times 10^5$)	A_{cell} (μm^2)	viáveis cells (%)	EC50 (μM)	Zona
FN1	0	0	0	9.3	51.1	100		no letal
	25	0.5	0.38	10.0	52.2	108 \uparrow +8%		no letal
	50	1.0	0.35	8.5	40.7	91 \downarrow -10%		subletal
	75	1.5	0.10	4.1	27.1	44 \downarrow -56%	78.5	referência
	100	2.0	0.12	2.4	16.6	26 \downarrow -74%		letal
	185	3.7	n.i	1.5	n.i	16 \downarrow -84%		letal
HUV-E-C	0	0	0	8.0	40.1	100		no letal
	25	0.5	0.38	6.9	39.1	86 \downarrow -14%		subletal
	50	1.0	0.35	6.3	35.9	78 \downarrow -22%		subletal
	75	1.5	0.10	3.4	32.8	43 \downarrow -57%	60.0	referência
	100	2.0	0.12	3.0	30.9	37 \downarrow -63%		letal
	185	3.7	n.i	0.8	n.i	10 \downarrow -90%		letal
RAW 264.7	0	0	0	6.3	14.1	100		no letal
	25	0.5	0.38	5.1	14.9	81 \downarrow -19%		subletal
	50	1.0	0.35	4.6	15.5	73 \downarrow -27%		subletal
	75	1.5	0.10	3.5	18.8	55 \downarrow -45%	72.9	referência
	100	2.0	0.12	2.5	19.2	39 \downarrow -61%		letal
	185	3.7	n.i	0.1	n.i	2 \downarrow -98%		letal

As abreviações N, V e A indicam numero de células ou nanopartículas, volume e área.

A segunda zona, denominada letal, foi definida para doses maiores do que aquelas sub-letais para os tempos correspondentes, resultando em uma diminuição média das populações celulares entre 51-95% em relação ao controle (Tabela 9 e 10).

Na Tabela 9 e 10, também são apresentadas as estimativas para os valores de N_{cells} , caracterizadas como discos cujas áreas superficiais foram obtidas anteriormente, assim como uma estimativa do número de nanopartículas em cada concentração que interage com os discos celulares. Cabe lembrar que as AgNPs estabilizadas em citrato, apresentaram uma forma aproximadamente esférica e raios hidrodinâmicos $R_{[Hd-AgNPs]}$, obtidos dos resultados de DLS (Tabela 6), que permaneceram constantes, porém a espessura da corona biomolecular aumenta com a concentração de prata. Os valores de N_{AgNPs} , foram obtidos

proporcionalmente utilizando-se as características de síntese das nanopartículas de estoque aproximadamente 1×10^{14} NPs/L a $250.3 \mu\text{M}$.

Tabela 10: *Resumo dos parâmetros morfológicos calculados para as bio-AgNPs e linhagens celulares a partir das análises de caracterização morfo-elétrica e viabilidade celular, em função da concentração após 48 horas de incubação do arranjo.*

Linhagem	AgNPs (μM)	Tempo de incubação						
		48 horas						
		N_{AgNPs} ($\times 10^{10}$)	V_{AgNPs} ($\times 10^{-3} \mu\text{m}^3$)	N_{cell} ($\times 10^5$)	A_{cell} (μm^2)	viáveis cells (%)	EC50 (μM)	Zona
FN1	0	0	0	10.0	50.1	100		no letal
	25	0.5	4.12	8.5	42.2	85 ↓ _{-15%}		subletal
	50	1.0	1.30	5.3	28.7	53 ↓ _{-47%}	50.0	referência
	75	1.5	0.46	3.6	28.3	36 ↓ _{-64%}		letal
	100	2.0	0.16	2.3	20.4	23 ↓ _{-77%}		letal
	185	3.7	n.i	0.7	n.i	7 ↓ _{-93%}		letal
HUV-E-C	0	0	0	7.3	40.5	100		no letal
	25	0.5	4.12	5.2	39.7	71 ↓ _{-29%}		subletal
	50	1.0	1.30	3.9	37.8	53 ↓ _{-47%}	49.6	referência
	75	1.5	0.46	2.7	16.6	36 ↓ _{-64%}		letal
	100	2.0	0.16	1.9	15.25	26 ↓ _{-74%}		letal
	185	3.7	n.i	0.3	n.i	4 ↓ _{-96%}		letal
RAW 264.7	0	0	0	9.5	14.4	100		no letal
	25	0.5	4.12	7.0	14.2	73 ↓ _{-27%}		subletal
	50	1.0	1.30	5.3	16.2	55 ↓ _{-45%}	53.5	referência
	75	1.5	0.46	4.7	18.1	49 ↓ _{-51%}		letal
	100	2.0	0.16	2.8	17.7	29 ↓ _{-71%}		letal
	185	3.7	n.i	0.1	n.i	1 ↓ _{-99%}		letal

As abreviações N, V e A indicam numero de células ou nanopartículas, volume e área.

Abordando os aspectos de viabilidade induzidos pelas bio-estruturas de AgNPs (bio-AgNPs) apresentados nesta seção, mudanças importantes foram observadas nas linhagens FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 no que se refere aos aspectos de morfologia, da área celular e de decréscimo na população celular devido a citotoxicidade quando o número das AgNPs aumenta e a corona biomolecular decresce na solução de 10% SFB+DMEM. Apesar deste trabalho não realizar experiências específicas para definir o mecanismo que desencadeia a citotoxicidade das AgNPs, estudos indicam que este tem sua origem no processo de internalização ou *uptake* das bio-nanopartículas pelas células, o que nos possibilita propor a seguinte explicação: uma vez que as bio-AgNPs são sempre as mesmas

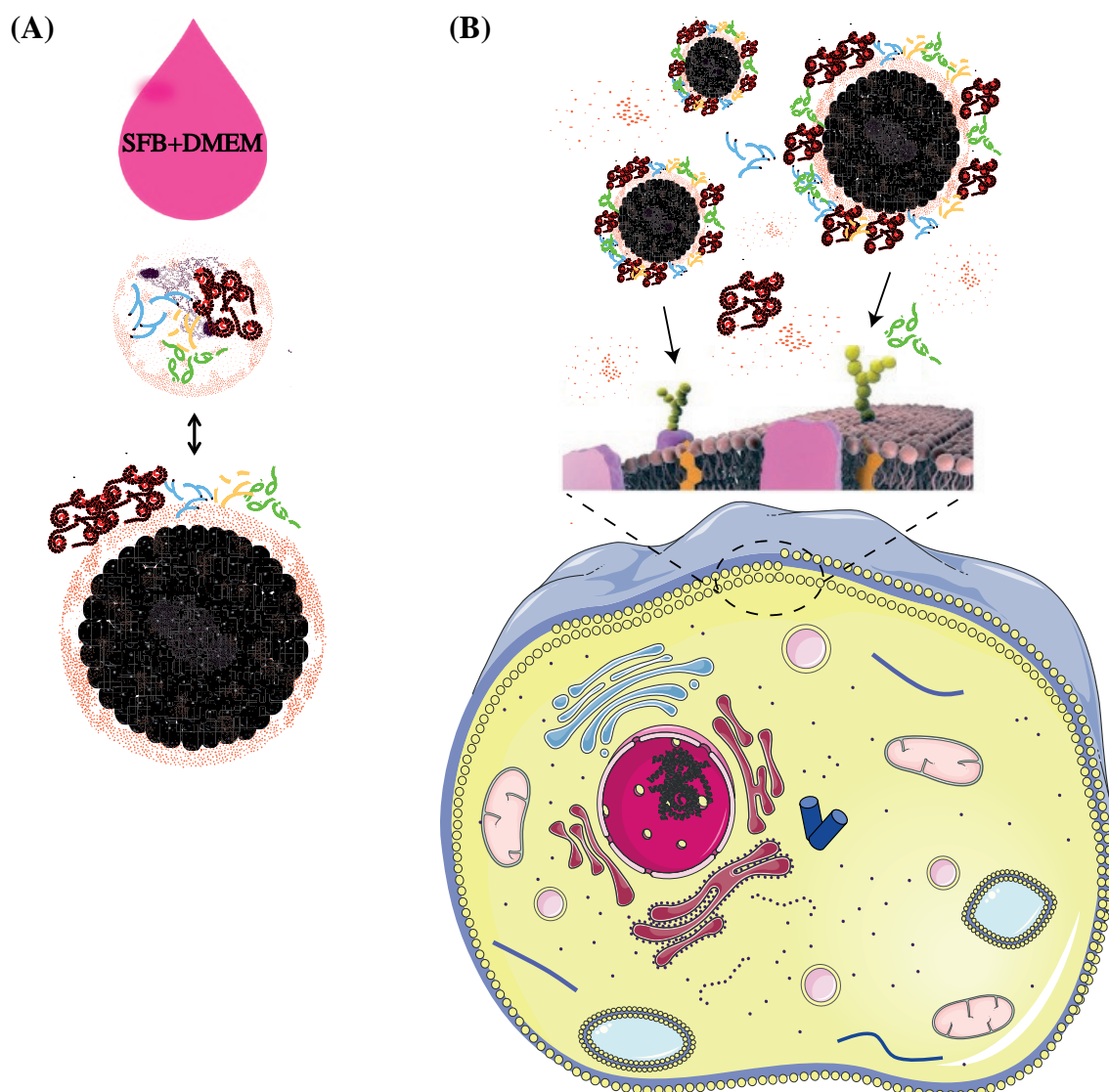


Figura 30: Modelos ilustrativos: (A) da interação entre as AgNPs e biomoléculas do meio de cultura suplementado para a formação da nova entidade bio-AgNPs, e (B) do processo de internalização dessas nas células através da interação com as proteínas receptoras da membrana celular.

utilizadas com todas as linhagens celulares, isto é, elas são caracterizadas com tendo a mesma quantidade de nanopartículas de prata e com a mesma espessura de corona biomolecular, ou diâmetro esférico para cada concentração molar em DMEM suplementado (ver a Figura 30-A e Tabela 9 e 10), então poderíamos esperar que a influência destas bio-estruturas seja de possuir afinidades específicas em suas respectivas proteínas receptoras sobre as proteínas da membrana celular (Ma et al., 2020; Cui et al., 2021), conforme ilustrado na Figura 30-B. Assim, as alterações observadas nos parâmetros celulares apresentados nas Tabelas 9 e 10 podem estar associados à citotoxicidade das AgNPs através do mecanismo de ingestão das células e da liberação posterior de íons de prata dentro do

citossol que desencadeiam o mecanismo citotóxico identificado como sendo do tipo dose e tempo dependentes (Ver Figura 30).

Como esperávamos, a citotoxicidade avaliada a partir da contagem de Neubauer e dos ensaios MTT parece depender da população de células viáveis que estão internalizando as estruturas de bio-AgNPs de tal forma que, quando o número de estas aumenta em função da concentração, a interação com as proteínas receptoras na membrana celular (Ma et al., 2020; Cui et al., 2021) é mais ativa e, portanto, a probabilidade de ingestão de nanopartículas para o interior da célula pode ser maior.

As características morfo-elétricas das bio-AgNPs relacionadas ao tamanho, formato quase esférico, bem como o potencial de superfície levemente negativo e constante, são variáveis importantes que parecem definir o grau de penetrabilidade das bio-nanopartículas para o interior das células justificando-se como fatores-chave em estudos citotóxicos (Park et al., 2011). Os dados obtidos dos ensaios de viabilidade demonstraram que para concentrações entre o intervalo de $75 \leq [\text{AgNPs}] \leq 185 \mu\text{M}$, onde as bio-AgNPs apresentam volumes menores (Tabela 9 e 10), em geral, estas tendem a ser internalizados mais facilmente pelas células que as de volumes maiores, desencadeando maiores mudanças nas células viáveis como na área celular, morfologia e taxa de crescimento. O tempo de incubação também parece afetar as células através da citotoxicidade, uma vez que as porcentagens das células viáveis são bastante reduzidas em 48 horas em comparação com 24 horas, pelo menos, x 10 menores em cada concentração (ver Tabela 9 e 10). Apesar das bio-AgNPs apresentarem um aumento de volume (Tabela 9 e 10) com o tempo, este efeito poderia ser explicado pelo maior tempo de interação entre as bio-AgNPs com as proteínas receptoras na membrana celular, também favorecendo a maior ingestão das nanopartículas pelas células. No entanto, devemos ainda considerar que um maior tempo de incubação, implica no esgotamento das componentes do meio de cultura celular.

Demonstramos anteriormente que as linhagens celulares FN1 e HUV-E-C foram mais suscetíveis a citotoxicidade ou internalização das bio-AgNPs em comparação com a linhagem RAW 264.7, sendo esta uma situação já esperada uma vez que cada tipo de célula resiste ou cede à uma lesão tecidual em função, por exemplo, de sua reserva antioxidante disponível e de sua atividade mitocondrial. Resultados equivalentes foram reportados por Kalishwaralal et al. 2010 e Arora et al. 2008, que mostraram as células da linhagem HUV-EC-C mais suscetíveis que as da linhagem FN1 após 24 horas de exposição.

Nesse mesmo trabalho, também mostraram que estas linhagens celulares apresentaram diferentes tipos de morte celular: células FN1 morreram através de apoptose e sinalização mitocondrial, enquanto células HUV-EC-C através de necrose a baixas concentrações de *AgNPs*. Outro resultado equivalente foi reportado por Haase et al. 2011, onde células RAW sofreram efeitos de citotoxicidade maximizados para um número determinado de nanopartículas entre $2.8 - 4.2 \times 10^{10}$ partículas (ver a Tabela 9 e 10), apresentando morte celular acompanhada por altos níveis de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species, ROS*).

Para finalizar esta discussão, vamos voltar a discutir as definições de zonas de letalidade citotóxica, sub-letal e letal, parametrizadas pelos valores EC50 mostrados na Tabela 9 e 10. Como pode ser visto, as linhagens celulares apresentaram intervalos de dose distintos para tempos diferentes tal que estão perdendo metade de sua população viável. A partir deste ponto para trás (doses inferiores), a chances de que essas linhagens imortalizadas possam restabelecer a confluência celular permanece latente, uma vez que condições de cultivo celular livre de nanopartículas sejam fornecidas e reguladas. Apesar deste trabalho não fornecer ensaios que abordem esta questão em específico, a argumentação atual permanece plausível e, portanto, podemos usar essas definições de zonas de citotoxicidade a partir de $[AgNPs] < 75 \mu M$ para 24 horas e $[AgNPs] < 50 \mu M$ para 48 horas pela proximidade das concentrações de 75 e 50 μM aos valores de EC50 encontrados por MTT. Essas classificações, em princípio, poderia nos ajudar no controle da população das células através do potencial citotóxico das bio-*AgNPs* que poderia ser utilizado a nosso favor ao promover aquelas populações celulares que favorecem especificamente a cada uma das fases de inflamação, proliferação e remodelação que ocorrem durante uma cicatrização normal de feridas cutâneas. Desta maneira, é possível inibir uma cicatrização anormal como, por exemplo, aquelas que dão origem aos queloides.

Iremos retornar nesta questão na seção a seguir, na qual abordaremos especificamente estudos de mudanças metabólicas nas células induzidos pelas nanopartículas de prata para os mesmos tempos de exposição apresentados nesta seção conforme indicado na Tabela 11, onde os valores de EC20 obtidos para a zona sub-letal foram aproximadamente 50 μM para 24 horas e 25 μM para 48 horas (ver Tabela 9 e 10), enquanto que os EC80 valores obtidos para a zona letal foram aproximadamente os mesmos, i.e., aproximadamente 100 μM para cada tempo de incubação (Tabela 9 e 10). Com esta estratégia,

caracterizamos alterações em vias metabólicas específicas induzidas por esses tratamentos que poderão permitir separar efeitos de situações basais e citotóxicas das células e, assim, alcançar uma melhor compreensão dos principais eventos metabólicos que poderiam ocorrer durante o processo de cicatrização induzido por esse tratamento.

Tabela 11: *Estratégia de medidas de Ressonância magnética nuclear, para caraterizar alterações em vias metabólicas específicas induzidas pelas bio-AgNPs nas limagens celulares FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7.*

Amostras	Tempo de incubação		
	zona	24 horas de incubação	48 horas de incubação
		AgNPs(μ M)	AgNPs(μ M)
controle	no letal	0	0
EC20	subletal	50	25
EC50	referência	75	50
EC80	letal	100	100

4.3 Análise metabolômica de células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 expostas a Bio-AgNPs

Neste capítulo, iremos descrever a atividade metabólica das três linhagens celulares utilizadas neste trabalho: células de fibroblastos humanos (FN1), células endoteliais humanas (HUV-EC-C) e macrófagos murino (RAW 264,7), quando estas são expostas a diferentes concentrações de AgNPs e tempos de incubação. A espectroscopia de ^1H -RMN de alta resolução de estado líquido foi utilizada para obter os perfis espectrais dos sobrenadantes de meio de cultura e de extratos celulares, providenciando informações mais detalhadas sobre os exometabolomas (metabólitos extracelulares) e endometabolomas (metabólitos intracelulares) em cada linhagem de células. Esta informação é crucial para interpretar os efeitos metabólicos induzidos pelas nanopartículas de prata para 24 e 48 horas de exposição, conforme veremos a seguir.

O comportamento dose-resposta em função do tempo induzido pelas bio-AgNPs sobre as células, resumido pelos parâmetros da Tabela 11, foi tomado como referência para selecionar as amostras de ^1H -RMN de extrato celular e de meio de cultura. As células foram expostas a concentrações efetivas EC20, EC50 e EC80 por 24 e 48 horas de incubação, i.e, 50, 75 e 100 μM para 24 horas e 25, 50 e 100 μM para 48 horas. Adicionalmente, a amostra controle também foi selecionada para ambos os tipos de amostras para servir como referência de comparações.

4.3.1 Metabólitos extracelulares dos meios de cultura

Durante a incubação *in vitro*, as células absorvem nutrientes do meio de cultura, mas também excretam produtos resultantes de sua atividade metabólica, os metabólitos extracelulares. Assim, as variações na composição do meio de cultura fornecem informações valiosas sobre a atividade metabólica celular. A Figura 31, 32 e 33 mostram os espectros de ^1H -RMN das amostras de meio de cultura que foram metabolizados pelas células das três linhagens estudadas, coletados após os períodos de incubação 24 e 48 horas nas diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

A maioria dos nutrientes orgânicos listados na formulação do meio de cultura (Tabela suplementar 1) foram detectados nos espectros ^1H -RMN para as amostras de meio de cultura das linhagens FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 após a exposição de prata,

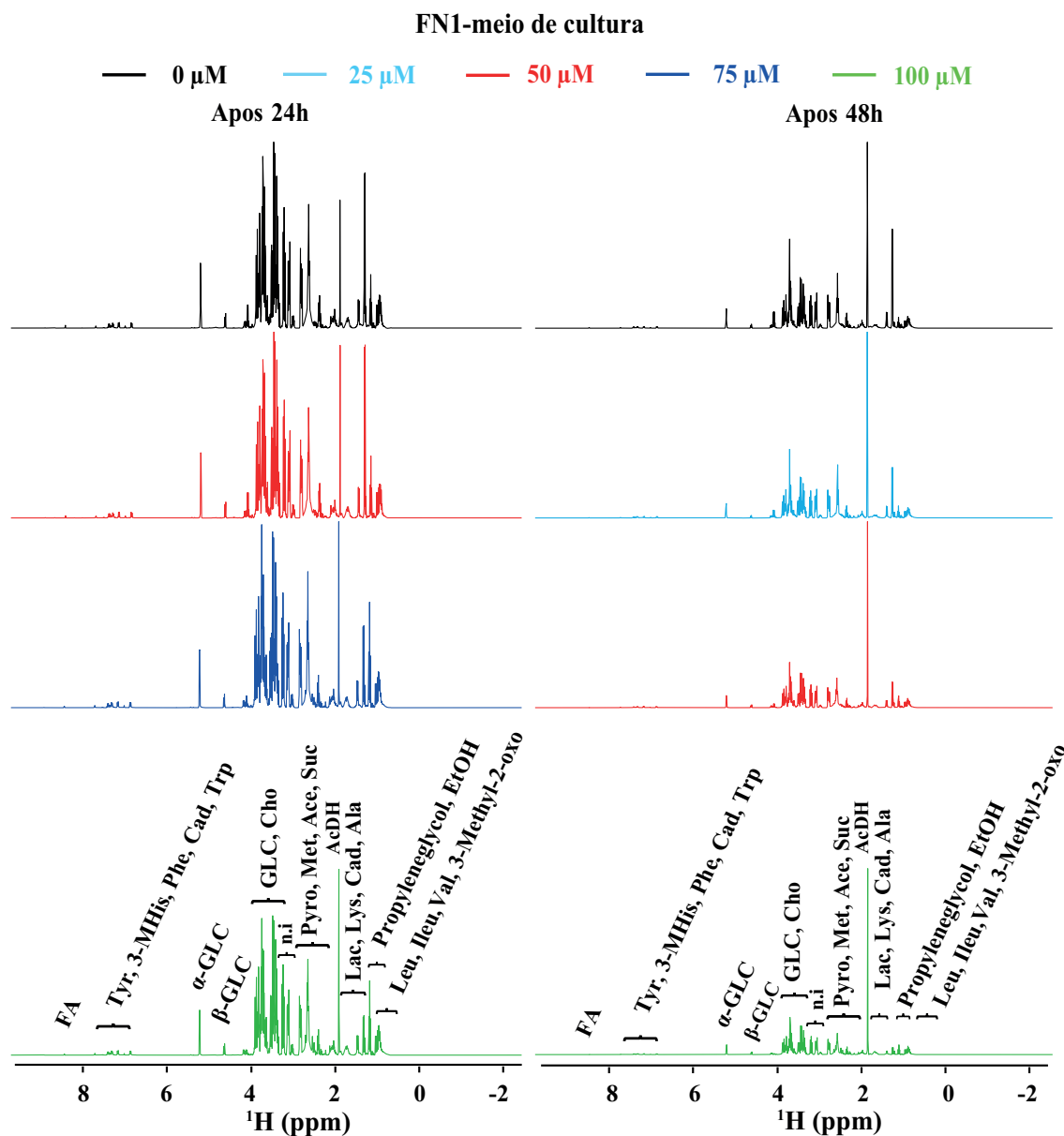


Figura 31: Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras de meio de cultura da linhagem celular FN1 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor preta), 25 μM (ciano), 50 μM (vermelho), 75 μM (azul) e 100 μM (verde). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular em meio de cultura com nanopartículas em diferentes concentrações. 23 (vinte e três) metabólitos foram encontrados na amostra de meio de cultura e são mostrados nos espectros de embaixo em acorância com a Tabela 12.

embora algumas vitaminas, por exemplo, tiamina e i-Inositol, presentes em concentrações abaixo de 20 μM , mostrarem apenas sinais muito fracos no espectro 1D, dificultando sua identificação ou qualquer análise quantitativa. Adicionalmente, alguns metabólitos que não estavam presentes no meio de cultura original (Anexo 5), foram identificados o que reflete o mecanismo de excreção das células. Este foi o caso do lactato (Lac), resultante

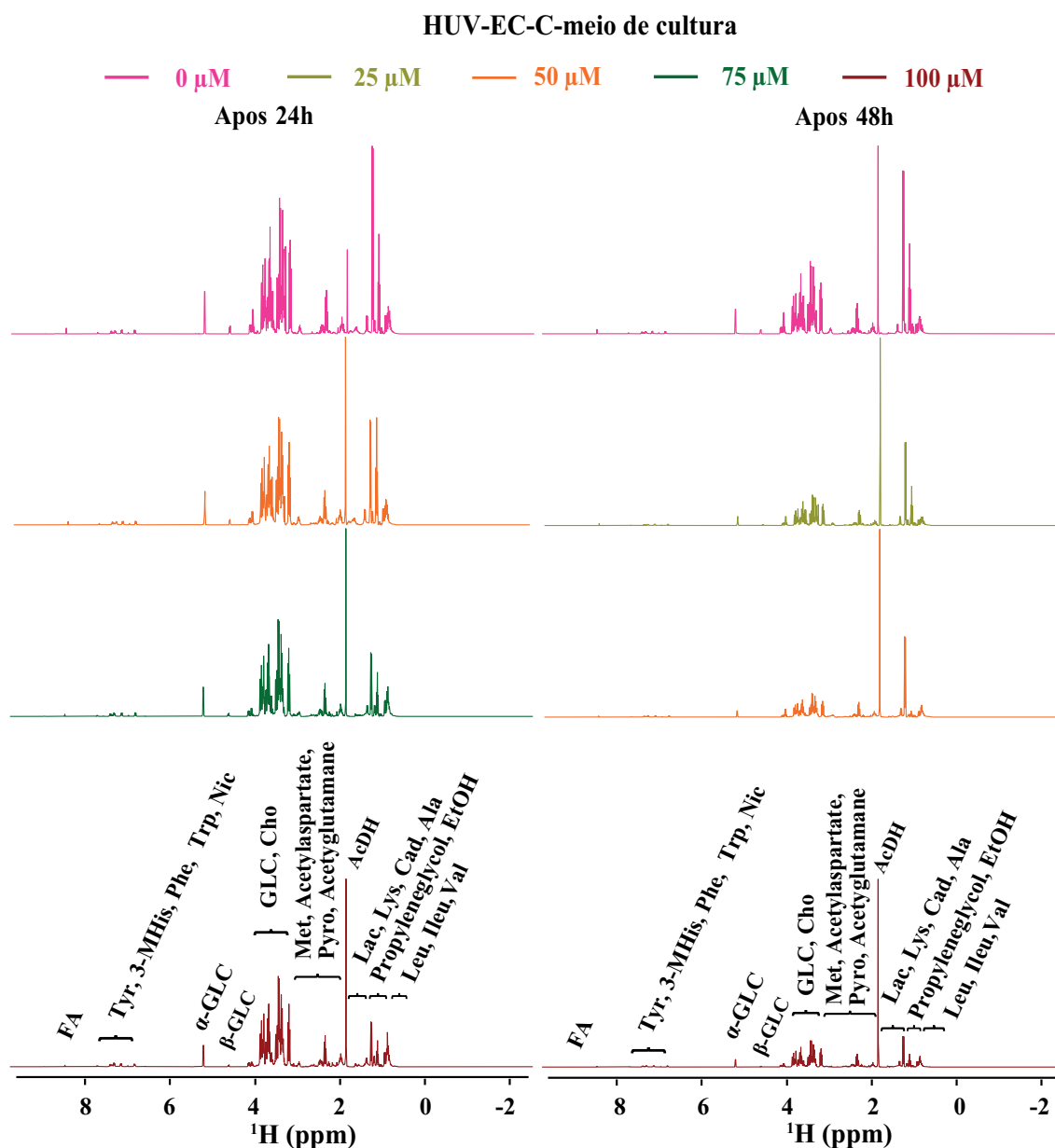


Figura 32: Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras de meio de cultura da linhagem celular HUV-EC-C tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor rosa), 25 μM (amarelo), 50 μM (laranja), 75 μM (verde escuro) e 100 μM (marrom). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular em meio de cultura com nanopartículas em diferentes concentrações. 23 (vinte e três) metabólitos foram encontrados na amostra de meio de cultura e são mostrados nos espectros de embaixo em acorãncia com a Tabela 12.

da fermentação láctica, ou do citrato, detectado apenas no meio de cultura condicionado das células da linhagem RAW 264.7 (ver Figura 33 e Tabela 12).

A lista completa da identificação dos metabólitos extracelulares detectados nos espectros de ^1H -RMN das amostras de meio de cultura das três linhagens celulares, após a

Database (HMDB). A abreviação dos nomes dos metabólitos é mostrada na versão inglesa para encurtar os nomes dos metabólitos nas análises, simplificando a visualização gráfica destas identificações.

Tabela 12: *Designação dos metabólitos identificados nos perfis de $^1\text{H-RMN}$ dos meios de cultura das linhagens celulares FN1, HUV-E-C e RAW 26.7 após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os metabólitos destacados em cor ciano correspondem aos nutrientes encontrados na formulação do meio acelular de cultura DMEM.*

Metabolitos	Abrev	Deslocamento químico $^1\text{H}(\text{ppm})$	célula exposta a AgNPs		
			FN1	HUV-E-C	RAW 264.7
<i>Isoleucina</i>	Ileu	0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.9, 3.1	✓	✓	✓
<i>Leucina</i>	Leu	0.9, 1.7, 3.7	✓	✓	✓
<i>Valina</i>	Val	1.0, 2.2, 3.6	✓	✓	✓
3-Metil-oxoalerato		0.9, 1.1, 1.4, 1.7, 2.9	✓		
Propilenglicol		1.1, 3.4, 3.5, 3.9	✓	✓	
Etanol	EtOH	1.2, 3.6	✓	✓	✓
<i>Treonina</i>	Thr	1.3, 3.6, 4.3			✓
Lactato	Lac	1.3, 4.1	✓	✓	✓
<i>Lisina</i>	Lys	1.4, 1.5, 1.7, 1.9, 3.0, 3.8	✓	✓	
Cadaverina	Cad	1.5, 1.7, 3.0	✓	✓	
Alanina	Ala	1.5, 3.8	✓	✓	✓
Acetato	AcOH	1.9	✓	✓	✓
Piroglutamato	Pyro	2.0, 2.4, 2.5, 4.2, 7.7	✓	✓	✓
N-Acetilglutamato		1.9, 2.0, 2.2, 4.1, 8.0		✓	
<i>Metionina</i>	Met	2.1, 2.2, 2.6, 3.9	✓	✓	✓
Acetona	Ace	2.2	✓		
Succinato	Suc	2.4	✓		
n.i		2.55-2.87	✓		
N-Acetilaspártato		2.0, 2.5, 2.7, 4.4, 7.9		✓	
Citrato		2.7, 2.5			✓
<i>Colina</i>	Cho	3.2, 3.5, 4.1	✓	✓	✓
<i>β – glicose</i>	β -GLC	4.6	✓	✓	
<i>α – glicose</i>	α -GLC	5.2	✓	✓	✓
<i>Tirosina</i>	Try	7.1, 6.8, 3.9, 3.2, 3.0, 3.2	✓	✓	✓
τ -Metilhistidina	3-Mhis	7.7, 7.0, 4.0, 3.7, 3.2, 3.1	✓	✓	✓
<i>Fenilalanina</i>	Phe	7.4, 7.3, 4.0, 3.3, 3.1	✓	✓	✓
<i>Triptofano</i>	Trp	10.2, 7.7, 7.5, 7.3, 7.2, 4.1	✓	✓	✓
Nicotinurato	Nic	8.9, 8.8, 8.7, 8.2, 7.6, 4.0		✓	
Formate	FA	8.4	✓	✓	✓

A abreviação de nomes dos metabólitos é mostrada na versão inglesa por fins de comodidade de análise.

4.3.2 Metabólitos polares intracelulares

Espectros de ressonância magnética nuclear ^1H -RMN de alta-resolução obtidos das amostras de extratos celulares das células das linhagens FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 após a exposição com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs por 24 e 48 horas são mostrados, respectivamente, na Figura 34, 35 e 36.

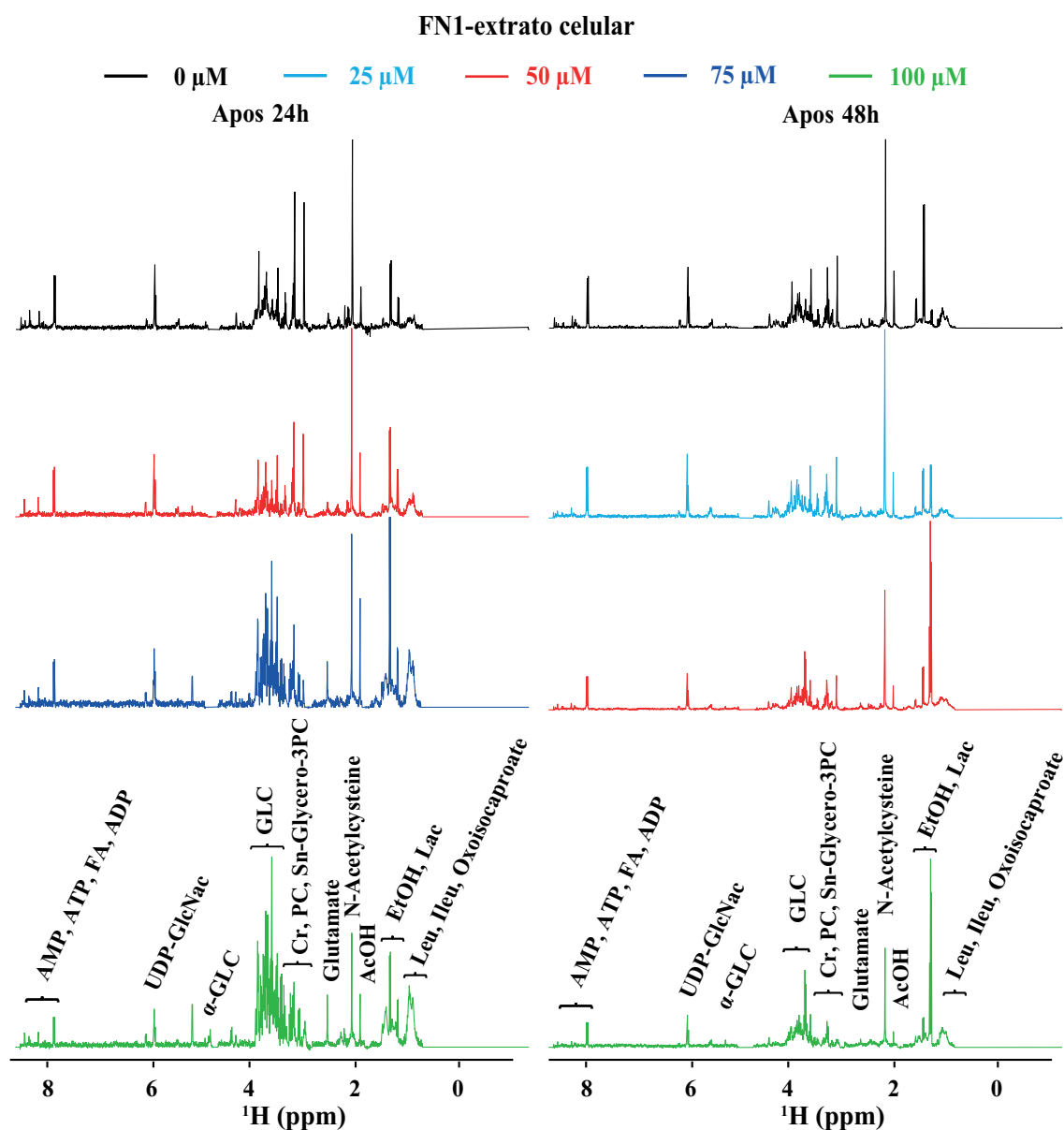


Figura 34: Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras do extrato celular da linhagem celular FN1 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor preta), 25 μM (ciano), 50 μM (vermelho), 75 μM (azul) e 100 μM (verde). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular com nanopartículas em diferentes concentrações. 17 (dezessete) metabólitos foram encontrados na amostra do extrato celular e são mostrados nos espectros de embaixo em acorrdância com a Tabela 13.

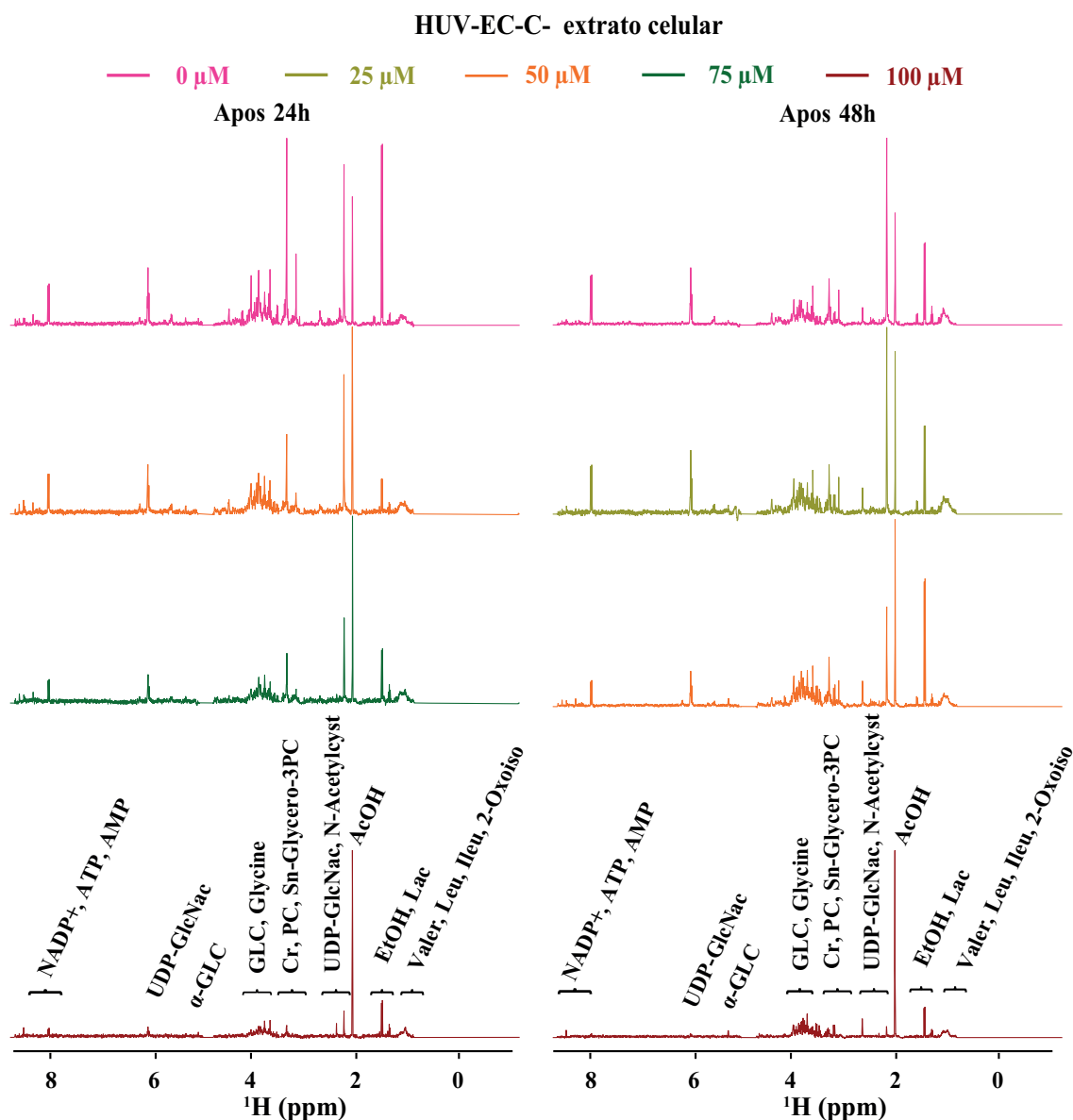


Figura 35: Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras do extrato celular da linhagem celular HUV-EC-C tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor rosa), 25 μM (amarelo), 50 μM (laranja), 75 μM (verde escuro) e 100 μM (marrom). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular com nanopartículas em diferentes concentrações. 18 (dezoito) metabólitos foram encontrados na amostra do extrato celular e são mostrados nos espectros de embaixo em acorãncia com a Tabela 13.

Para cada linhagem celular exposta às quatro concentrações diferentes de prata e os dois tempos de incubação, o número de replicatas em cada grupo gerado foi de ao menos seis amostras, todas elas avaliadas nos experimentos de ^1H -RMN 1D (ver Tabela 4).

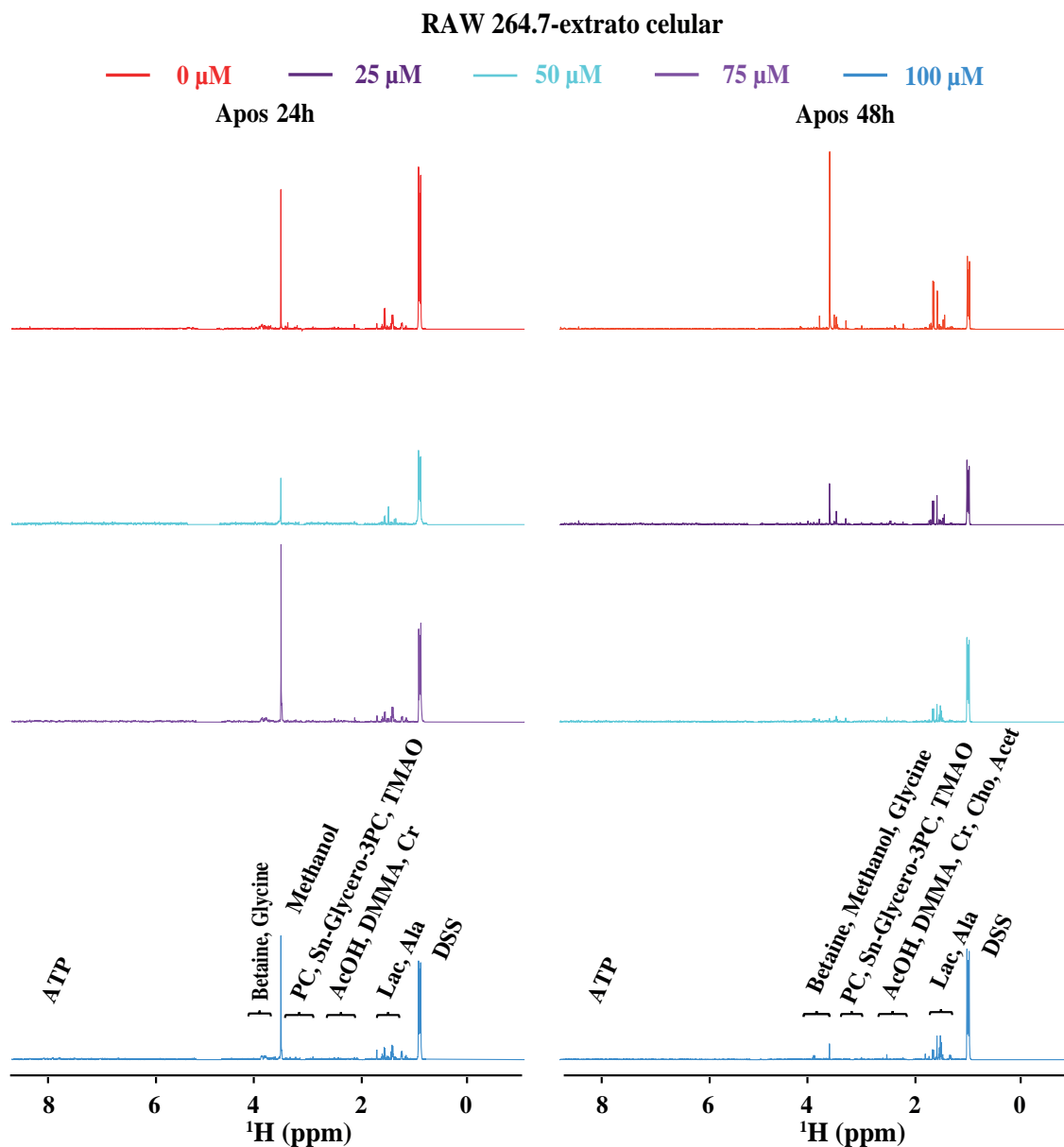


Figura 36: Espectros de alta resolução ^1H -RMN obtidos a 400 MHz para as amostras do extrato celular da linhagem celular RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações molares de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor vermelha), 25 μM (roxo escuro), 50 μM (celeste), 75 μM (roxo) e 100 μM (azul claro). Os painéis esquerdo e direito correspondem, respectivamente, aos resultados de 24 e 48 horas de incubação celular com nanopartículas em diferentes concentrações. 12 (doze) metabólitos foram encontrados na amostra do extrato celular e são mostrados nos espectros de embaixo em acorância com a Tabela 13. O deslocamento químico padrão do 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) é mostrado para o RAW 264.7 por comodidade dos espectros.

A Tabela 13, assim como as linhas de alta-resolução dos espectros de ^1H -RMN da Figura 34, 35 e 36 (parte inferior), relaciona o número de metabólitos intracelulares presentes nos extratos polares de cada linhagem de células expostas as bio-AgNPs por 24 e 48 horas. A identificação foi realizada, conforme descrito anteriormente, através das

bases de dados das plataformas eletrônicas. Um total de 24 (vinte e quatro) metabólitos intracelulares foram identificados nos espectros.

Tabela 13: *Designação dos metabólitos identificados nos perfis de 1H -RMN dos extratos celulares das linhagens celulares FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. A abreviação de nomes dos metabólitos é mostrado na versão inglesa por fins de comodidade de análise.*

Metabolitos	Abrev	Deslocamento químico 1H (ppm)	célula exposta a AgNPs		
			FN1	HUV-E-C	RAW 264.7
Isoleucina	Ileu	0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.9, 3.1	✓	✓	
Leucina	Leu	0.9, 1.7, 3.7	✓	✓	
2-Oxoisocaproato		0.9, 2.1, 2.6	✓	✓	
Valerato	Valer	0.9, 1.3, 1.5, 2.2		✓	
Etanol	EtOH	1.2, 3.6	✓	✓	
Lactato	Lac	1.3, 4.1	✓	✓	✓
Alanina	Ala	1.5, 3.8			✓
Acetato	AcOH	1.9	✓	✓	✓
N-Acetilcisteína		2.1, 2.9, 4.4, 8.0	✓	✓	
Glutamato		2.0, 2.1, 2.3, 2.4, 3.8	✓		
Dimetilamina	DMMA	2.7			✓
Creatina	Cr	3.0, 3.9	✓	✓	✓
Colina	Cho	3.2, 3.5, 4.1			✓
O-fosfocolina	PC	3.2, 3.6, 4.2	✓	✓	✓
Sn-Glycero-3-PC		3.2, 3.6, 3.7, 3.9, 4.3	✓	✓	✓
Trimetilamina N	TMAO	3.2			✓
Betaine		3.2, 3.9			✓
Glicina		3.6		✓	✓
α -glicose	α -GLC	5.2	✓	✓	
Uridine difosfato	UDP-GlcNAc	2.1, 3.8, 4.2, 4.4, 6.0, 8.3	✓	✓	
NADP+		4.2, 4.5, 6.0, 8.1, 8.2, 8.8		✓	
AMP		4.0, 4.4, 4.8, 6.1, 8.2	✓	✓	
ATP		4.3, 4.4, 4.6, 8.3, 8.5	✓	✓	✓
Formate	FA	8.4	✓		
ADP		4.2, 4.4, 4.6, 6.1, 8.3	✓		

Os nomes completos dos metabolitos UDP-GlcNAc e TMAO são Uridine difosfato-N-acetilglucosamina e Trimetilamina N-óxido.

Na região inicial do eixo de desvio químico, 0.9-2.7 ppm, foram detectados os metabólitos intracelulares: aminoácidos como isoleucina, leucina e alanina, lactato, acetato, dimetilamina entre outros. Na região 3.0-5.2 ppm, os sinais detectados foram atribuídos principalmente a Creatina, fosfocolina, Sn-glycero-3-PC, Trimetilamina N-óxido, glicose entre outros. Na região de altos valores de desvio químico, 6.0-8.0 ppm, foram detectados: ácido orgânico (Formate) e alguns nucleotídeos (UDP, NADP+, AMP, ATP e ADP).

Apesar do conjunto de metabólitos identificados nas três linhagens celulares após

a exposição com nanopartículas de prata serem aproximadamente os mesmos, diferenças em suas respectivas quantidades relativas foram notadas mostrando diferenças no metabolismo entre elas. Por exemplo, aminoácidos foram encontrados nas células das linhagens FN1 e HUV-EC-C, mas não nas células da RAW 264.7. Em particular, a molécula de glicose foi identificada em FN1 e HUV-EC-C através do duplete em 5.2 ppm, mas que não se apresentou nos espectros das células RAW 264.7. Além disso, Trimetilamina N-óxido e Betaine foram encontradas em macrófagos RAW 264.7 através de um singlete em 3.2 ppm e outro em 3.9 ppm, mas não nas células das outras linhagens.

4.3.3 Análises estatística dos endo-exo metabolitos

Apesar da maioria das linhas espectrais de alta-resolução mostradas na Figura 31, 32, 33, 34, 35 e 36 terem sido identificadas satisfatoriamente para as diferentes linhagens celulares, diferenças mais ou menos aparentes podem ser observadas diretamente em suas intensidades correspondentes quando as concentrações de nanopartículas de prata vão aumentando, tanto em 24 e 48 horas de exposição. Como descrito anteriormente, cada metabólito identificado tem picos e posições em *ppm* característicos no espectro, cuja área integrada é proporcional à concentração relativa de um metabólito, também chamada de nível do metabólito. Para identificar mudanças sutis nos níveis correspondentes, os valores das áreas dos metabólitos em função das concentrações e dos tempos de tratamento, foram processados usando métodos estatísticos multivariados e univariados. Desta forma, podemos avaliar em detalhes e com precisão estatística mudanças nos metabólitos extracelulares e intracelulares e, portanto, mudanças no metabolismo celular induzidos pelos tratamentos de nanopartículas de prata.

O primeiro passo nesse processo de avaliação metabólica é aplicar um método estatístico multivariado, por exemplo, o método supervisionado PLS-DA, onde os resultados obtidos são mostrados em gráficos de *score plot* e *VIP score* (ver a seção 2.3). Os gráficos de *score plots* identificam as tendências de agrupamento entre grupos de amostras com metabólitos semelhantes, enquanto os *VIPs scores* identificam os metabólitos responsáveis por tais tendências (Bloise et al. 2020). O segundo passo é utilizar um método estatístico univariado adotando um nível de significância mínimo para os resultados obtidos, o qual iremos descrever mais adiante (maiores detalhes, podem ser revistos na seção 2.4).

Estes agrupamentos identificados tanto para as amostras de extrato celular e de meio de cultura é uma forte indicação de que existem variações nas concentrações dos metabólitos endo-exo das células FN1 quando a concentração molar das nanopartículas aumenta (ou diminui). Também pode-se inferir que estas mudanças parecem estar ocorrendo já na primeira concentração, diminuindo para concentrações mais altas uma vez que a distância de separação entre os centros de distribuição dos pontos do grupo controle e tratado com 50 μM é maior do que a distância entre 75 e 100 μM . Inspeccionando as combinações Comp.1 *vs* Comp.3 na Figura 37-C e -D para o mesmo tempo de incubação, o cenário prévio parece simplesmente se repetir para o extrato celular e o meio de cultura, no entanto, desta vez com modificações nas distâncias de separação entre os grupos. A distância de separação entre os grupos da direita são menores e os grupos da esquerda maiores. No geral, à medida que a ordem das componentes aumenta, estas tendem a diminuir sua representatividade estatística do conjunto completo de dados (Madsen et al. 2010; Worley and Powers 2013). Os valores percentuais mostrados nos parêntesis para cada componente, evidencia esta observação. Assim, para a combinação Comp.1 *vs*. Comp.2, é de se esperar que os grupos formados apresentem as maiores amplitudes de diferenças entre os valores das áreas comparadas que os grupos formados pela combinação Comp.1 *vs*. Comp.3. Esta regra se mantém para a combinação Comp.2 *vs*. Comp.3 (não mostrada aqui), que apresentaria, progressivamente, menores amplitudes de diferenças que as outras. Portanto, podemos concluir haver uma tendência geral para ambos os tipos de amostras após 24 horas de exposição das bio-AgNPs que estabelece as maiores diferenças nos níveis dos metabólitos endo-exo se concentram mais entre as amostras controle e 50 μM e menos entre as amostras 75 e 100 μM . Analisando agora as combinações Comp.1 *vs*. Comp.2 após 48 horas de exposição das células FN1 pelas bio-AgNPs, Figura 37-E e -F, pode-se ver que no caso do *score plot* das amostras de extrato celular, a primeira dose que induz modificações nos níveis dos metabólitos é 25 μM ao invés de 50 μM do caso de 24 horas de exposição. Se inspecionarmos a mesma combinação de componentes para amostras de meio de cultura, as doses de 25 e 50 μM parecem ser similares e distantes do caso controle, sugerindo quase o mesmo efeito metabólico que ocorre nas amostras de células mas que agora pode ser detectado indiretamente nas amostras de meio de cultura. A combinação Comp.1 *vs*. Comp.3 nas mesmas doses de 25 e 50 μM são agora mais semelhantes para o extrato celular (Figura 37-E e -G), mas mais diferenciado para o meio de

grupos para as células tratadas com 50 e 75 μM é agora mais próxima entre si e distante dos grupos controle e 100 μM . O perfil metabólico dos extratos celulares indica que as células HUV-EC-C tendem a ser mais resistentes às mudanças nos níveis dos metabólitos em relação ao das células da linhagem FN1 quando estas são tratadas com doses de bio-AgNPs começando com 50 μM . Por outro lado, a proximidade dos grupos 50 e 75 μM nas amostras de meio cultura parece indicar um diferente aspecto no metabolismo celular que pode ser agora acessado dos dados do meio cultura, em relação aos dados do extrato celular. As informações trazidas pela combinação Comp.1 *vs.* Comp.3 é complementar àquela revelada pela combinação Comp.1 *vs.* Comp.2 no sentido de corroborar que os níveis dos metabólitos endo-exo do grupo controle e das células expostas em 50 μM com bio-AgNPs exibem as menores diferenças para as amostras de extrato celular e de meio de cultura (Figura 38-C e -D). O comportamento apresentado pelos agrupamentos de pontos das elipses após 48 horas de incubação das células da linhagem HUV-EC-C (Figura 38-E e -F), mostram que baixas doses como, por exemplo, 25 μM poderiam estar já impactando nos níveis dos metabólitos endo-exo assim como os aquelas mostradas após 24 horas de incubação que são ligeiramente mais altas

Para 24 horas de incubação, o resultados dos gráficos PLS-DA das amostras de extrato celular e meio de cultura indicam um impacto interessante das bio-AgNPs sobre as células da linhagem RAW 264.7. A combinação Comp.1 *vs.* Comp.2 (Figura 39-A e -B) mostra uma separação clara entre o grupo controle e as células expostas as nanopartículas. Para as amostras de extrato celular a distribuição de centros dos pontos das células tratadas com 50, 75 e 100 μM é próxima, mas distante do grupo controle (Figura 39-A). Entretanto, para as amostras de meio de cultura esta situação muda e a distribuição dos centros para 50, 75 μM e o grupo controle é agora mais próxima, mas distante do grupo 100 μM (Figura 39-B). As informações dadas pela combinação Comp.1 *vs.* Comp.3, assim como os valores calculados para R^2 e Q^2 mostrados nas Figuras 39-C e -D, corrobora a informação da Comp.1 *vs.* Comp.2. Portanto, podemos concluir que a exposição à concentrações maiores ou igual a 50 μM cria mudanças nos níveis dos metabólitos intracelulares. Entretanto, para o caso do meio de cultura, a exposição em 50 e 75 μM parece induzir a mesma diferença metabólica nos níveis dos metabólitos extracelulares em relação ao caso controle. Por outro lado, com base no comportamento mostrado nos *score plots* após 48 horas de incubação (Figura 39-E e -F),

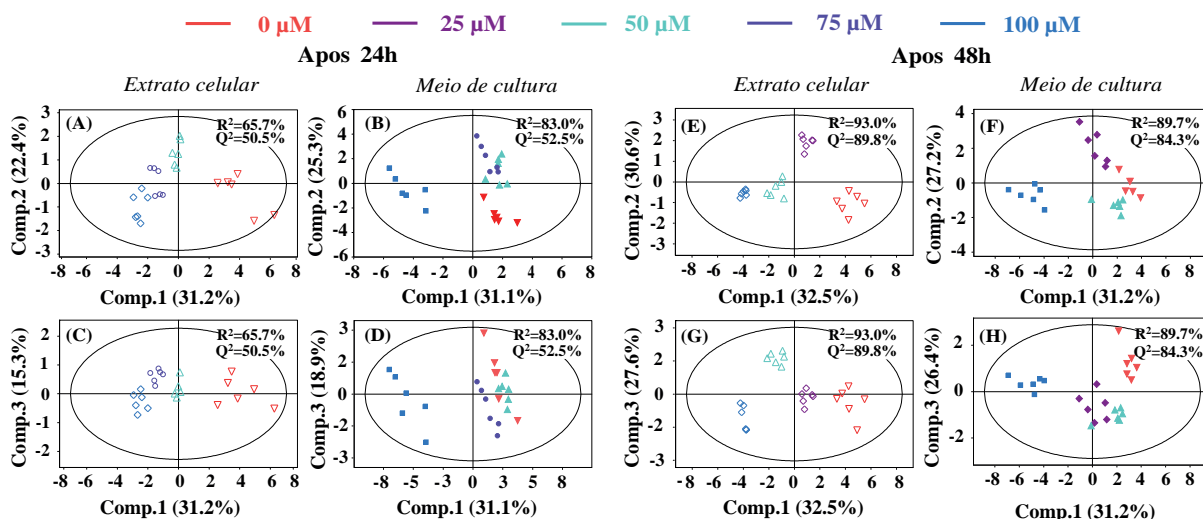


Figura 39: Resumo dos gráficos de score plots construídos a partir das análise de dados do extrato celular e meio de cultura da linhagem RAW 264.7, após a exposição com diferentes concentrações de bio-AgNPs: 0 μM ou controle (linha de cor vermelha), 25 μM (roxo escuro), 50 μM (celeste), 75 μM (roxo) e 100 μM (azul claro). Os quatro gráficos da esquerda e direita designam, respectivamente, os resultados após 24 horas (A-D) e 48 horas (E-H) de tratamento como as nanopartículas, apresentando colunas correspondentes para o extrato celular (A, C, E, G) e meio de cultura (B, D, F, H). Nos parêntesis são mostradas as porcentagens de covariância de dados explicados, e os valores dos parâmetros preditivos obtidos para R^2 e Q^2 .

poderia-se argumentar que tempos de incubação longos e doses baixas, como 48 horas e 25 μM , podem impactar no metabolismo das células RAW 264.7 quase da mesma forma que doses mais altas e menor tempo de incubação.

A identificação dos metabólitos endo-exo que variam seus níveis de concentração nas amostras de extrato celular e meio de cultura quando as células das linhagens FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 são expostas a diferentes concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas, foi realizada através da análise multivariado dos *VIP score*. Esta ferramenta do PLS-DA, permite identificar os metabólitos responsáveis pelas tendências de agrupamentos mostrados nos *score plots*, com $VIP > 1$ (Bloise et al., 2020).

Para a linhagem celular FN1, as amostras de extrato celular, após 24 e 48 horas de exposição, identificaram: α -GLC, lactato, alanina, glicina, leucina, isoleucina, glutamato, creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycero-3-PC, N-Acetilcisteína, UDP-GlcNAc, AMP, ADP, formate e 2-Oxoisocaproato. Entretanto, para o meio de cultura em ambos tempos, os exo-metabólitos foram: α -GLC, lactato, succinato, AcOH, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, alanina, acetona, piroglutamato, colina, propilene Glicol, formate e 3-Metil-2-

oxovalerato.

Já para a linhagem celular HUV-E-C, as amostras de extrato celular, após 24 e 48 horas de exposição, identificaram: lactato, AcOH, alanina, glicina, leucina, isoleucina, creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycero-3-PC, NADP+, N-Acetilcisteína, UDP-GlcNAc, valerato e AMP. Entretanto, para o meio de cultura em ambos tempos, os exo-metabólitos foram: α -GLC, lactato, AcOH, leucina, isoleucina, alanina, triptofano, acetona, piroglutamato, N-Acetilglutamato, N-Acetilaspártato, propilene Glicol, cadaverina e formate.

Por fim, para a linhagem celular RAW 264.7, as amostras de extrato celular após 24 e 48 horas de exposição, identificaram: lactato, alanina, glicina, creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycero-3-PC, betaine e trimetilamina N-oxide. Entretanto, para o meio de cultura em ambos tempos, os exometabólitos foram: lactato, citrato, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, triptofano, piroglutamato, colina e τ -metilhistidina.

4.3.3.2 *Análise univariada*

Entre todos os metabólitos endo-exo identificados através da análise multivariada *VIP score*, apenas aqueles com significância estatística (ou seja, aqueles que apresentam diferenças significativas nos níveis de concentração entre os grupos de 0, 25, 75 e 100 μ M) ($p < 0.05$), foram retidos nas avaliações das vias metabólicas. Para isso, utilizamos métodos estatísticos paramétricos e não paramétricos escolhidos de acordo com a distribuição de normalidade dos dados (Heckler 2005; Massad et al. 2004). Por exemplo, se os dados do metabólito X segue uma distribuição normal o método paramétrico aplicado foi o ANOVA ou, em contraposição, se a distribuição é não-normal, o método não paramétrico foi o Kruskal-Wallis. Adicionalmente, a fim de saber se o nível de concentração do metabólito X para o grupo controle é diferente do grupo 50 μ M, ou este é diferente dos grupos 75 e 100 μ M, foi aplicado o *test-Fisher* com 95% de nível de confiança.

Os resultados dessas análises para os extratos celulares e meios de cultura das linhagens celulares FN1, HUV-EC-C E e RAW 264.7, após a exposição das bio-AgNPs por 24 e 48 horas, são apresentados nas Figuras suplementares 2, 3 e 4. No entanto, o resumo desses resultados são mostrados a seguir na Figura 40, 41 e 42 para as células das linhagens FN1, HUV-E-C E e RAW 264.7, respectivamente. Os dados foram numericamente tabulados e mapas de calor usados para demonstrar as mudanças percentuais de aumento (positivo %) e diminuição (negativo %) nos níveis de concentração dos metabólitos endo-

exo. Para tanto, os níveis dos metabólitos das amostras controle (0 μM) foram adotados como referência nas análises (0 *shift*). *Chaves*: Os exo-metabolitos listados na cor ciano são aqueles presentes originalmente no meio de cultura e, portanto, consumidos pelas células; e “n.d.” significa não detectável como classificador de grupo.

Para a linhagem celular FN1, a Figura 40-A apresenta mudanças nos níveis dos endo-metabolomas dos extratos de células após 24 e 48 horas de exposição com as bio-AgNPs. Para 24 horas de exposição, um aumento sucessivo nos níveis da α -GLC, leucina e 2-Oxoisocaproate em função da concentração de prata é observado até 479 %, 139 % e 72 % para 100 μM em relação ao controle. Também, em relação ao caso controle, relevantes diminuições acima do 50% foram notadas para o glutamato, creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycero-3-PC, N-Acetilcisteína e UDP-GlcNAc. Adicionalmente, os níveis do formate e ADP diminuíram sucessivamente até um 32% e 41 % para 100 μM em comparação ao controle. Para 48 horas de exposição de 25 até 100 μM , diminuições sucessivas nos níveis de todos os endometabolitos foram observadas tal que os aminoácidos e N-Acetilcisteína apresentaram um decaimento de até 50%, no entanto, a creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycero-3-PC, UDP-GlcNAc e AMP ficaram acima de 50%.

As mudanças provocadas nos exo-metabolitos das amostras do meio de cultura das células FN1 expostas por 24 e 48 horas tiveram uma influência notável no consumo de substratos e excreção metabólica (Figura 40-B). Para ambos os tempos de exposição, um aumento na excreção do AcOH, acetona e succinato (24 horas), assim como a diminuição no consumo da α -GLC, lactato, alanina, piroglutamato, colina, propilene glicol, formate, 3-Metil-2-oxovalerato e, provavelmente, nos aminoácidos foram observadas em função da concentração de prata. Entre esses exo-metabolitos, os níveis do AcOH e acetona apresentam particularmente uma variação alta, mudando mais do 96% e 239% para 24 horas e 170% e 93% para 48 horas na concentração de 100 μM em relação ao controle.

Para a linhagem celular HUV-EC-C, Figura 41-A, detectou-se mudanças nos níveis dos endo-metabolomas dos extratos de células após 24 e 48 horas de exposição com as bio-AgNPs. Para 24 horas de exposição, um aumento sucessivo nos níveis do acetato, leucina e valerato em função da concentração de prata pode ser observado em relação ao caso controle. Entre esses endo-metabolomas, o nível do AcOH apresentou particularmente

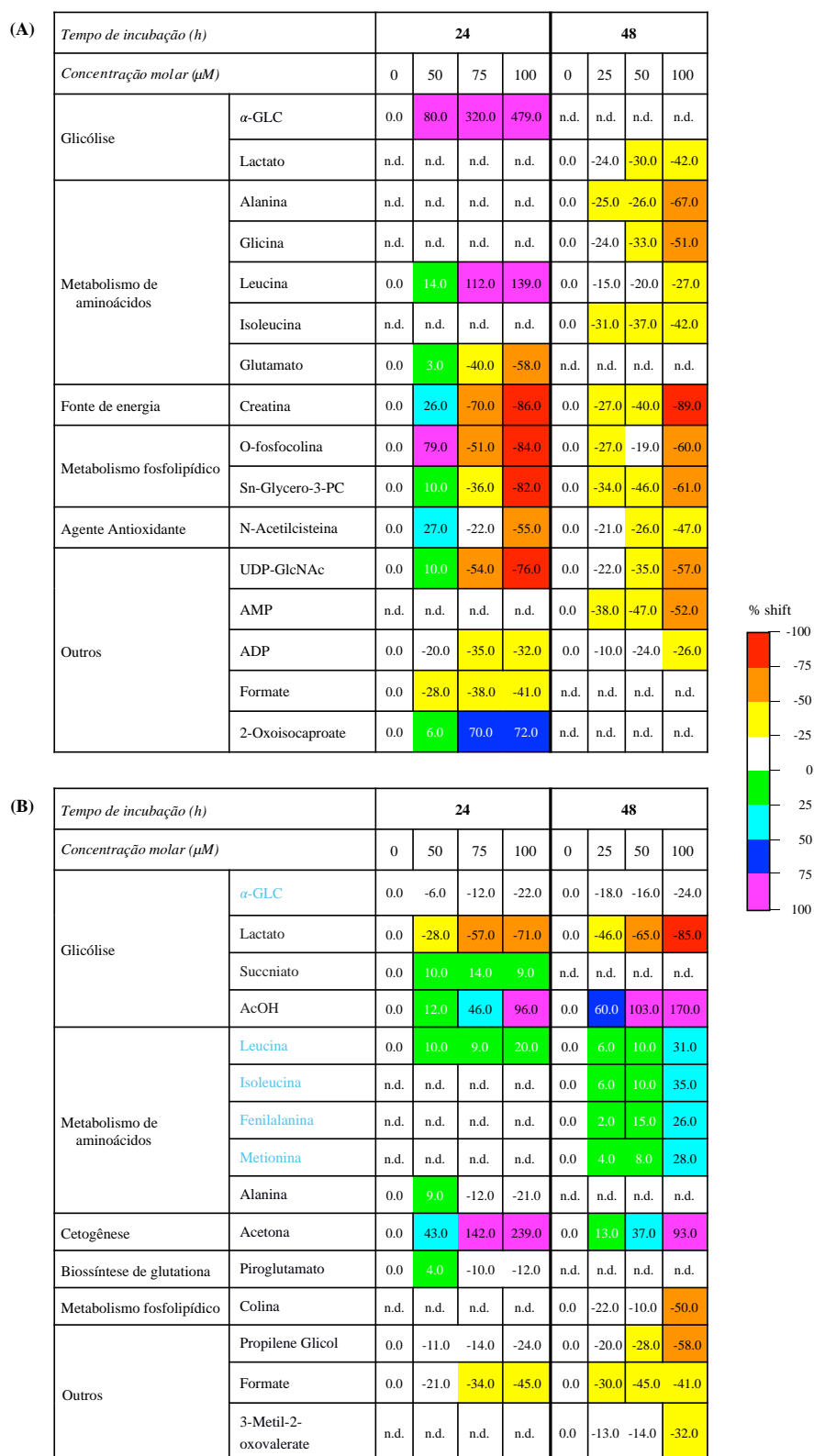


Figura 40: Mapas de calor dos principais metabólitos variados em (A) extratos celulares, (B) meio de cultura, da célula FN1 expostas a concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os mapas são coloridos de acordo com % de variação dos metabólitos em relação aos controles. Cores consecutivas que são cercadas por linhas pretas mostram níveis de concentração diferentes ($p < 0.05$).

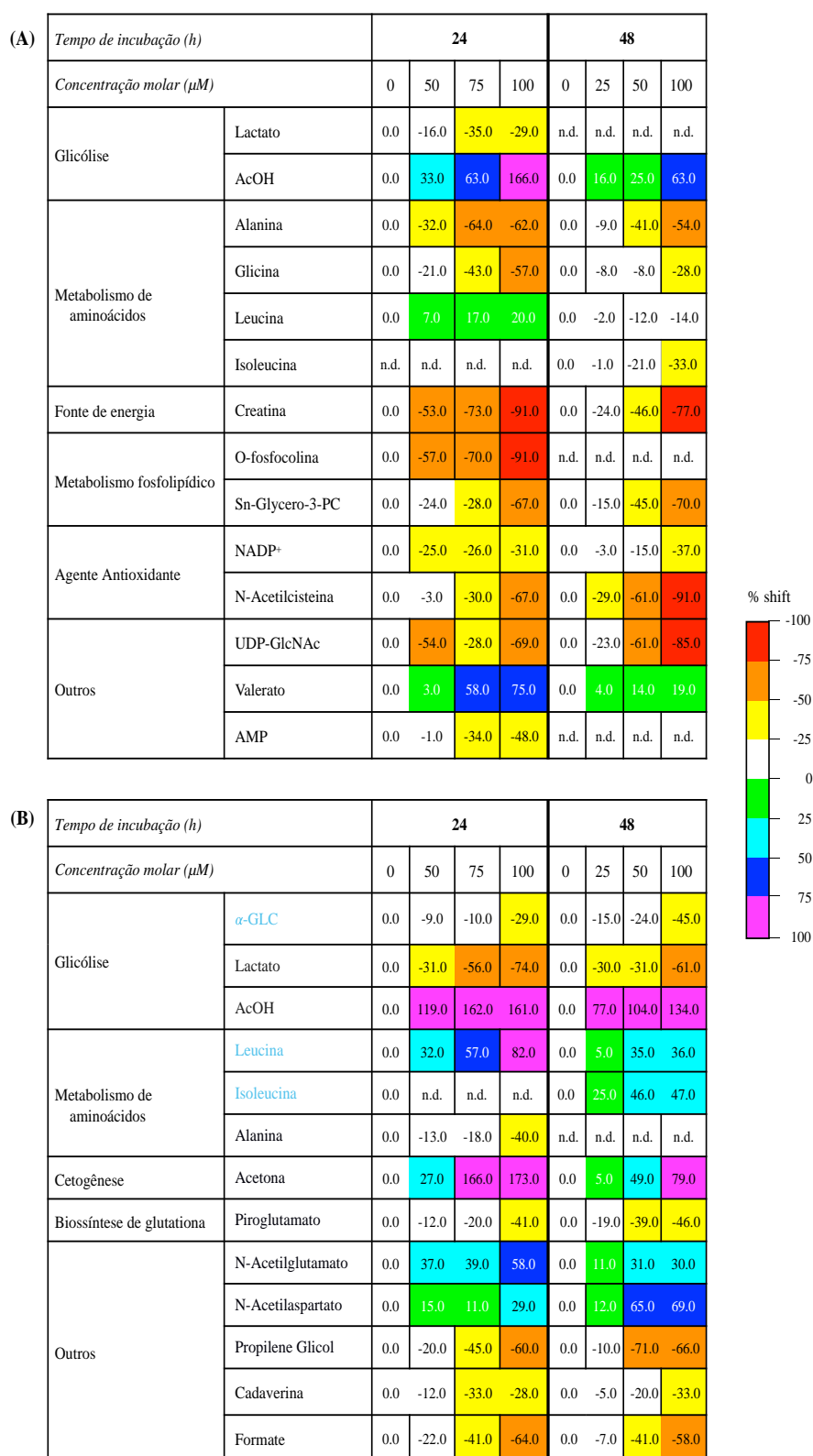


Figura 41: Mapas de calor dos principais metabólitos para (A) extratos celulares, (B) meio de cultura, da célula HUV-EC-C expostas a concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os mapas são coloridos de acordo com % de variação dos metabólitos em relação aos controles. Cores consecutivas que são cercadas por linhas pretas mostram níveis de concentração diferentes ($p < 0.05$).

uma variação alta, aumentando mais de 166% para 100 μM . Relevantes diminuições, acima do 60%, também foram observadas para alanina, glicina, creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycerol-3-PC, N-Acetilcisteína e UDP-GlcNAc em relação ao caso controle para 100 μM . Adicionalmente, os níveis do lactato, NADP+ e AMP também diminuíram sucessivamente em função da concentração de prata até 29%, 31% e 48% para 100 μM . Para 48 horas de exposição com 25, 50 e 100 μM bio-AgNPs, foram observadas diminuições sucessivas nos níveis da alanina, creatina, Sn-Glycerol-3-PC, N-Acetilcisteína e UDP-GlcNAc acima de 60%, entretanto, a glicina, isoleucina e NADP+ diminuíram em seus níveis de concentração em relação ao controle até um 28%, 33% e 37% para 100 μM .

As mudanças provocadas no exo-metaboloma das amostras de meio de cultura das células da linhagem HUV-EC-C expostas por 24 e 48 horas tiveram uma influência no consumo de substratos e excreção metabólica (Figura 41-B). Para ambos os tempos de exposição, um aumento na excreção do AcOH, acetona, N-Acetilglutamato e N-Acetilaspártato, assim como a diminuição nos níveis de consumo da α -GLC, lactato, alanina (24 horas), piroglutamato, propilene glicol, cadaverina, formate e provavelmente nos aminoácidos (leucina e isoleucina) foi observada em função da concentração de prata. Entre esses exo-metabólitos, da mesma forma que para linhagem FN1, os níveis do AcOH e acetona apresentam particularmente uma variação alta, excretando mais do 161% e 173% para 24 horas e 134% e 79% para 48 horas na concentração de 100 μM em relação ao controle.

Na Figura 42-A, pode-se observar que a sucessiva adição das bio-AgNPs na linhagem celular RAW 264.7, induz alterações nos níveis de concentração dos endo-metabolomas em relação ao caso controle, tal que para 24 horas de exposição, alanina, creatina, O-fosfocolina e trimetilamina N-Oxide mostraram uma diminuição acima de 50%. Lactato, glicina, betaine, e Sn-Glycero-3PC também tiveram seus níveis reduzidos em mais de 30% para 100 μM . Após 48 horas de exposição podemos observar o efeito metabólico no tempo, onde as maiores reduções nos níveis de concentrações acima de 80% foram detectadas para lactato, Glicina, creatina, O-fosfocolina, Sn-Glycerol-3 PC, betaine, e trimetilamina N-Oxide. Alanina também apresentou uma redução de 72 % após 100 μM de exposição. As variações nos níveis de concentração metabólicas dos exo-metabólitos analisados das amostras de sobrenadantes de meio cultura das células RAW 264.7 expostas a diferentes concentrações de bio-AgNPs em relação ao controle, são mostradas na Tabela 42 B. Para

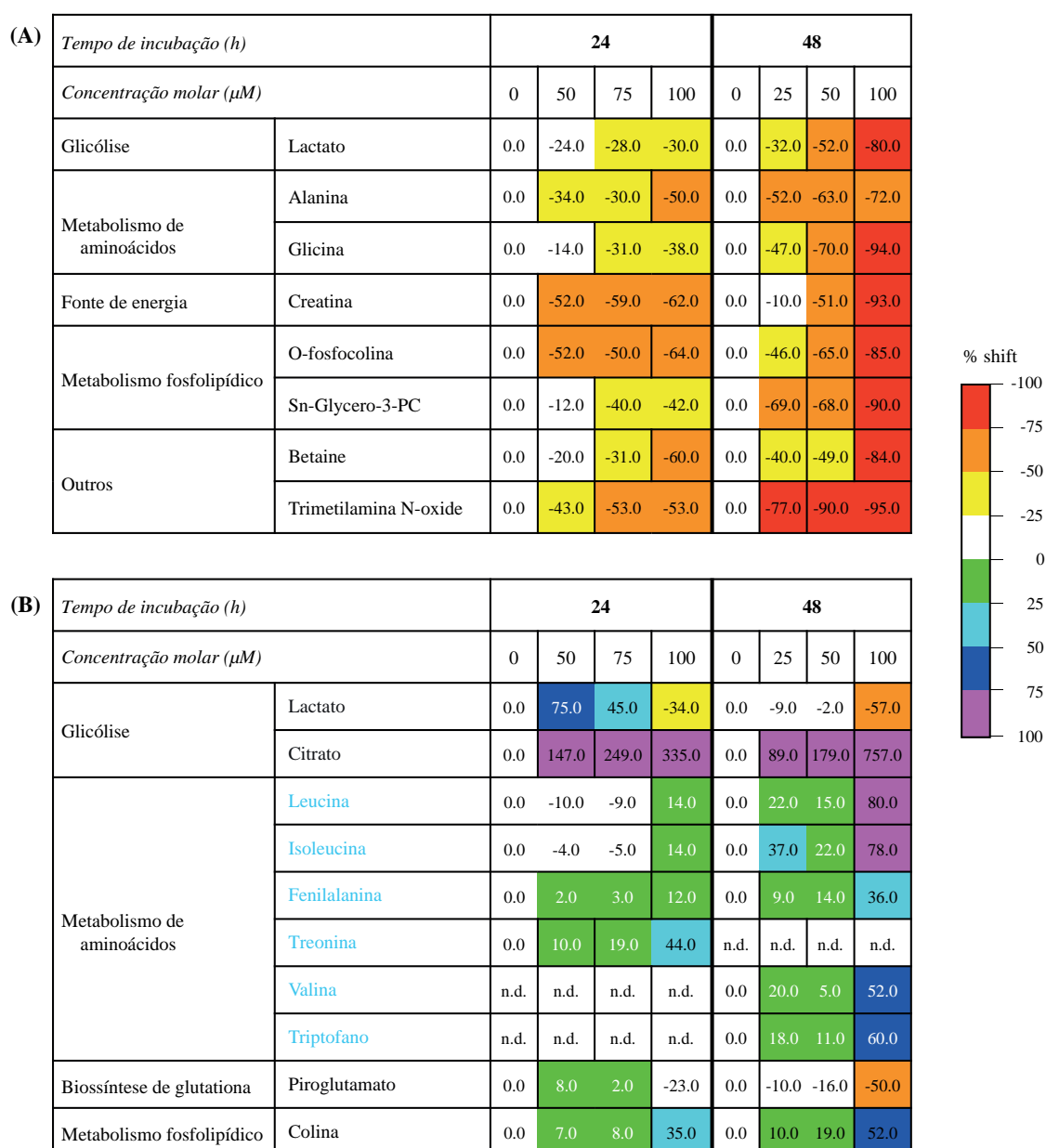


Figura 42: Mapas de calor dos principais metabólitos para (A) extratos celulares, (B) meio de cultura, da célula RAW 264.7 expostas a concentrações de bio-AgNPs por 24 e 48 horas. Os mapas são coloridos de acordo com % de variação dos metabólitos em relação aos controles. Cores consecutivas que são cercadas por linhas pretas mostram níveis de concentração diferentes ($p < 0.05$).

24 horas de exposição, um aumento na excreção do citrato e colina, assim como uma ligeira diminuição no consumo de leucina, isoleucina, fenilalanina e treonina, foram observadas em função das partículas de prata. Entre essas variações, os níveis de excreção do citrato apresentaram particularmente um incremento alto, mudando mais de 300% para a concentração de 100 μM . Lactato e piroglutamato parecem ser mais excretados para as primeiras concentrações, 50 e 75 μM , após 24 horas de incubação, no entanto, uma

diminuição em seus respectivos níveis para 34 e 23% foram observadas à 100 μM de prata, indicando uma clara redução nas taxas de excreção associadas à dose letal. Aumento na excreção do citrato para 757% e uma diminuição no consumo dos aminoácidos leucina, isoleucina, fenilalanina, valina e triptofano também foi observado após 48 horas de incubação e 100 μM . No entanto, colina está mostrando um aumento na excreção de 52%, enquanto o lactato e piroglutamato estão diminuindo em sua excreção para 57% e 50% quando as células foram expostas a 100 μM e 48 horas.

4.3.4 **Discussão das variações nas principais vias metabólicas das células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7**

No processo de cicatrização de feridas, os macrófagos M1 e M2 são necessários para iniciar a fase inflamatória através da eliminação de micro-organismos e a estimulação de células fibroblastos (Schett e Neurath, 2018). Entretanto, na fase de proliferação e remodelação, a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos para a produção de colágeno, assim como o início da angiogênese através das células endoteliais são importantes para formação do tecido de granulação, e portanto, dar-se a cicatrização da ferida (Su et al., 2010; Carmeliet, 2005). É amplamente aceito que se os macrófagos M1/M2, fibroblastos e células endoteliais apresentam um desequilíbrio em seus níveis de proliferação celular, esses poderiam propiciar uma inadequada fase inflamatória, proliferação e remodelação, levando a formação de tumores fibroproliferativos (queloides) ou cicatrizes hipertróficas (HTS) (Xu et al., 2020; Zheng et al., 2021). Portanto, se tais eventos pudessem ser controlados através da regulação das principais vias metabólicas envolvidas nessas células, ajustando o tempo e concentração dos terapêuticos, em princípio, nós poderíamos otimizar os processos e prevenir a formação indesejável de cicatrizes anormais.

O presente trabalho propôs usar a citotoxicidade das bio-nanopartículas de prata com diferentes diâmetros de corona segundo a concentração molar, através de 24 e 48 horas de exposição para tratar as células. O acesso a essas informações metabólicas nos permitirá avaliar o impacto no metabolismo das células, assim como as doses e os mecanismos de citotoxicidade dependentes do tempo. Dos dados analisados, a dinâmica temporal dos metabolomas das três linhagens celulares foi caracterizada através de uma abordagem conhecida como "perfil metabólico" (Bacchi et al. 2014), onde os metabólitos endo-exo identificados com relevância estatística são resumidos na Figura 40, 41 e 42, respectiva-

mente, para as células FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7. Nestas figuras, as vias metabólicas sensibilizadas também foram identificadas satisfatoriamente para cada linhagem celular, as quais serão discutidas a seguir.

4.3.4.1 Células FN1 e HUV-EC-C

Apesar de não termos conseguido obter evidências diretas do metabólito piruvato no espectro de ressonância magnética, podemos inferir a atividade glicolítica das células FN1 e HUV-EC-C, através da α -glicose, lactato e adicionalmente do AcOH. Os endo- e exo-metabolomas fornecem informações valiosas que mostram como as bio-AgNPs podem desempenhar um papel de dose e tempo dependentes nesta via metabólica; em outras palavras, na forma como as células tratadas produzem energia bioquímica (moléculas de ATP). A molécula de piruvato é o produto final da glicólise (ver Figura 43) que pode divergir para a via aeróbica através de sua descarboxilação levando a formação da coenzima acetil-CoA, um substrato primário para o TCA, para produzir duas moléculas de ATP e coenzimas portadoras de elétrons. Estas, por sua vez, podem seguir o metabolismo mitocondrial da fosforilação oxidativo produzindo aproximadamente 15 vezes mais moléculas de ATP para as células (Watt et al 2010). As células têm outro mecanismo energético menos eficiente de dirigir a molécula de piruvato, por exemplo, através de vias anaeróbicas quando é convertido em lactato através da fermentação láctica, ou oxidar-se, transformado-se em acetato (AcOH). Ambas moléculas de lactato e AcOH foram detectadas nos extratos celulares e meios de cultura para de células das linhagens FN1 e HUV-EC-C expostas as nanopartículas de prata em ambos os tempos de incubação e seus correspondentes níveis foram consistentes com a tendência de oxidar o piruvato ao invés de ativar a produção de ATP usando a via de fermentação de ácido láctico, sugerindo que a bio-AgNP está induzindo as células ao desperdício energético. A avaliação do consumo de glucose nos dados do exo-metaboloma, indicam que a exposição da prata está acelerando o metabolismo glicolítico das células para produzir piruvato em detrimento de energia, como discutido acima. Adicionalmente, as células da linhagem FN1 incubadas por 24 horas, mostraram uma tendência dependente da dose em gastar progressivamente moléculas de glucose deixadas no ambiente celular. Estes resultados são consistentes com o comprometimento do metabolismo energético das células, o qual apresenta uma maior absorção de glucose que, por sua vez, são oxidadas em piruvato e AcOH, produzindo assim

menos moléculas de ATP.

Células famintas geralmente procuram rotas metabólicas alternativas para atender suas necessidades energéticas quando as convencionais estão saturadas por qualquer motivo, neste caso, devido à citotoxicidade das bio-AgNPs. Por exemplo, a acetona é uma molécula resultante do metabolismo cetogênico (ver Figura 43). Duas moléculas da enzima acetil-CoA divergem do TCA para produzir acetoacetil-CoA, que é transformado em β -hidroxibutirato e acetoacetato, conduzindo finalmente à acetona (Misra e Oliver, 2015). Os dados de endo-metabolomas revelam um excedente da acetona excretada para o meio de cultura pelas células das linhagens FN1 e HUV-EC-C respondendo a uma condição estressante que acelera esta via metabólica, especialmente durante as primeiras 24 horas de incubação. As células podem utilizar níveis intracelulares de creatina (e fosfocreatina), detectados nos dados de endo-metabolomas, para o armazenamento de energia temporal e espacial, ativando o metabolismo PCR/Cr (Schlattner et al., 2006). Observamos uma tendência geral das células das linhagens FN1 e HUV-EC-C tratadas, para ambos os tempos de incubação, apresentarem uma diminuição na produção da creatina, exceto num caso específico em que as células FN1 foram tratadas com 50 μ M de bio-AgNPs durante 24 horas. Adicionalmente, moléculas de succinato, detectadas nos exo-metabolomas das células FN1 após 24 horas de exposição, providenciam uma evidência direta da ativação do TCA ao ser produzido no ciclo a partir da liberação de moléculas de succinil-CoA, produzindo apenas uma molécula de ATP neste processo. Estas análises, sugerem que a citotoxicidade induzida pelas bio-AgNP força as células a uma situação de elevada procura energética quando a taxa de utilização do ATP sobrecarrega a sua produção por outras vias metabólicas como discutimos anteriormente para os metabolismos do TCA, da fosforilação oxidativa e da cetogênese.

Alguns aminoácidos detectados nos dados de endo-metabolomas fornecem indicadores essenciais sobre a presença de um processo de degradação de proteínas que pode estar ocorrendo nas células expostas às nanopartículas. Por exemplo, os níveis de leucina, isoleucina, glicina, alanina e glutamato tendem geralmente a diminuir nos dados do endo-metabolomas após o tratamento das células das linhagens FN1 e HUV-EC-C durante 24 e 48 horas. Para o caso específico da leucina, observou-se um aumento dos seus níveis após a incubação durante 24 horas de ambas as linhagens celulares. Nos dados dos exo-metabolomas, com exceção da alanina, os níveis da leucina, isoleucina, fenilala-

nina e metionina aumentaram sistematicamente em função da dose das bio-AgNPs para ambos os tempos de incubação, sugerindo uma redução nas respectivas taxas de consumo pelas células. Independentemente da origem desses aminoácidos, seja pela degradação das proteínas ou provenientes do meio de cultura, todos eles podem ser facilmente utilizados pelas células, através da biossíntese convergente em alguns substratos de alta energia por degradação de suas respectivas cadeias de carbono em processos oxidativos típicos do metabolismo dos aminoácidos (Kanehisa et al., 2021). Por exemplo, o piruvato pode ser produzido a partir de alanina e glicine, assim como o acetil-CoA da leucina, isoleucina e fenilalanina. As células podem utilizar estes substratos para repor os intermediários do ciclo TCA e assim reequilibrar todo o ciclo quando há necessidade. A partir da redução dos níveis desses metabolitos, poderíamos sugerir que os aminoácidos estão sendo usados pela células tratadas para produzir mais acetil-CoA em relação às células de controle. Em contraste, os dados de exo-metabolomas indicam uma situação oposta em que menos aminoácidos do meio de cultura estão sendo usados pelas células expostas para produzir intermediários para o TCA. Este aparente e complexo cenário que emerge de ambos os metabolomas para as células expostas parece apontar que, em geral, a citotoxicidade inerente das bio-AgNPs pode causar um bloqueio do TCA, apesar da produção de piruvato e acetil-CoA permanecerem quase que inalterada.

A molécula de NADP⁺, biossintetizada no metabolismo da Glutathione, desempenha um papel importante na redução de proteínas oxidadas inativas através da remoção de pontes dissulfetos, regeneração de grupos SH oxidados (por exemplo, ROS), restabelecendo assim as funções originais nas células (Forman et al., 2009). A N-Acetilcisteína, um composto orgânico pertencente aos aminoácidos N-acyl-alfa, é um importante precursor do piroglutamato, bem como da glutathione (Chong et al., 2018). Ao analisarmos os níveis de NADP⁺ e N-Acetilcisteína, estes mostraram uma tendência de diminuir para as células das linhagens FN1 e HUV-EC-C expostas às nanopartículas para ambos os tempos de incubação. Por outro lado, o nível do piroglutamato mostrado nos dados de exo-metaboloma, apresenta uma tendência decrescente para FN1 e HUV-EC-C à medida que a dose das bio-AgNPs aumenta, independentemente do tempo de incubação. Se menos Piroglutamato está sendo excretado pelas células para o meio de cultura e menos N-Acetilcisteína e NADP⁺ é encontrado no extrato celular em comparação ao controle, então pode-se sugerir que as células das linhagens FN1 e HUV-EC-C em condições de

exposição estão, provavelmente, dirigindo seu metabolismo para uma elevada produção de agentes antioxidantes tais como a Glutathione (ver Figura 43). Considerando que uma evidência convincente para este mecanismo foi identificada e quantificada, é possível concluir que as células sofrem diferentes níveis de stress oxidativo induzidos pelas bio-AgNP em função da sua dose, tal que as células endoteliais demonstraram ser mais sensíveis que as células FN1.

O metabolismo fosfolipídico pode ser avaliado através das mudanças nos níveis de O-fosfocolina e Sn-Glycerol-3-PC no endo-metaboloma das células das linhagens FN1 e HUV-EC-C expostas às bio-AgNPs (ver Figura 43). Estes metabólitos são componentes essenciais das membranas celulares sintetizadas a partir da colina e catalisadas pela síntese CTP (Chang e Carman, 2008). Apesar de termos detectado apenas colina livre no exo-metaboloma de FN1 após 48 horas de incubação, ambas as moléculas foram encontradas no endo-metaboloma das duas linhagens celulares demonstrando uma tendência geral em diminuir seus níveis de concentração em função da dose das bio-AgNP utilizada no tratamento. Este comportamento sugere que a citotoxicidade das nanopartículas está induzindo uma desaceleração no metabolismo fosfolipídico e, conseqüentemente, nas taxas de proliferação das células como observado nos resultados obtidos a partir de ensaios de citotoxicidade, conforme resumidos pela Tabela 40 e 41.

Com base em outros metabólitos identificados no endo-metaboloma e exo-metaboloma das células das linhagens FN1 e HUV-EC-C, outras vias metabólicas sensibilizadas pelas bio-AgNPs puderam ser identificadas. Por exemplo, os níveis do propilene glicol diminuem progressivamente nos meios de cultura para ambas as linhagens celulares em ambos tempos de incubação. Este metabólito é usado no metabolismo do propanoato celular para produzir propanoil-CoA pela condensação do grupo thiol-CoA com o grupo carboxílico de ácido propiônico (Wongkittichote et al., 2017). Dependendo da necessidade da célula, o propanol-CoA pode eventualmente levar à formação de succinil-CoA, um importante intermediário no TCA. Esta observação apoia a nossa premissa de que as bio-AgNPs impactam nesta parte específica do metabolismo energético, resultando numa desaceleração deste em alguns de seus intermediários bioquímicos. Formate, é o ácido carboxílico mais simples que participa no metabolismo de compostos de um carbono. Geralmente são submetidos a reações de transmetilação, sendo responsável por sinalizar a ruptura da cadeia de transportes de elétrons mitocondriais no metabolismo da fosforilação oxidativa, impactando

assim a capacidade celular para produzir energia pela inibição da atividade da enzima citocromo-c oxidase (Wishart et al., 2018). Como os níveis de excreção deste metabólito foram diminuídos nos meio de cultura para as células das linhagens FN1 e HUV-E-C após a exposição com as bio-AgNPs por 24 e 48 horas de incubação, poderíamos esperar uma desaceleração da enzima citocromo em comparação ao controle e, portanto, sinalizando uma deficiência das funcionalidades das mitocôndrias em produzir energia.

O N-Acetilglutamato e N-Acetilaspártato são dois metabólitos excretados pelas células da linhagem HUV-EC-C tratadas com nanopartículas de prata. Estes apresentaram um aumento sistemático em seus respectivos níveis em comparação com o caso controle, como mostrado no exo-metaboloma correspondente. Ambos os metabólitos desempenham um papel no metabolismo da biossíntese de aminoácidos (Wishart et al., 2018), fornecendo evidências de que o fenótipo das células influencia a resistência aos efeitos citotóxicos das bio-AgNPs, como observado anteriormente nos ensaios citotóxicos, reforçando a validade dos resultados metabólicos. A cadaverina é outro metabólito excretado apenas pelas células da linhagem HUV-EC-C, apresentando níveis baixos em relação ao caso controle, conforme mostrado no exo-metaboloma correspondente (Tabela 41-B). Este metabólito é o primeiro subproduto da degradação da lisina formado pela descarboxilação bacteriana que ocorre no metabolismo dos aminoácidos (Wishart et al., 2018). Nossos dados sugerem que o metabolismo da lisina da HUV-EC-C é desacelerado pela dose e pelo tempo dos tratamentos com bio-AgNPs.

Para concluir a análise dos metabólitos que mudaram com o tratamento das nanopartículas de prata, o uridine difosfato (UDP-GlcNAc), excretado por ambas as linhagens celulares, conforme mostrado no endo-metaboloma, está progressivamente diminuindo à medida que a dose das bio-AgNPs aumenta. Este metabólito desempenha um papel importante na modificação das proteínas núcleo citoplasmáticas, atuando como substrato de doadores para resíduos de serina e de treonina que ligam o N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) com as proteínas (Wishart et al., 2018; Hart et al., 2007). Os nossos dados mostram que o tratamento com as bio-AgNPs podem induzir mudanças nesta classe de proteína, em geral, inibindo tais modificações.

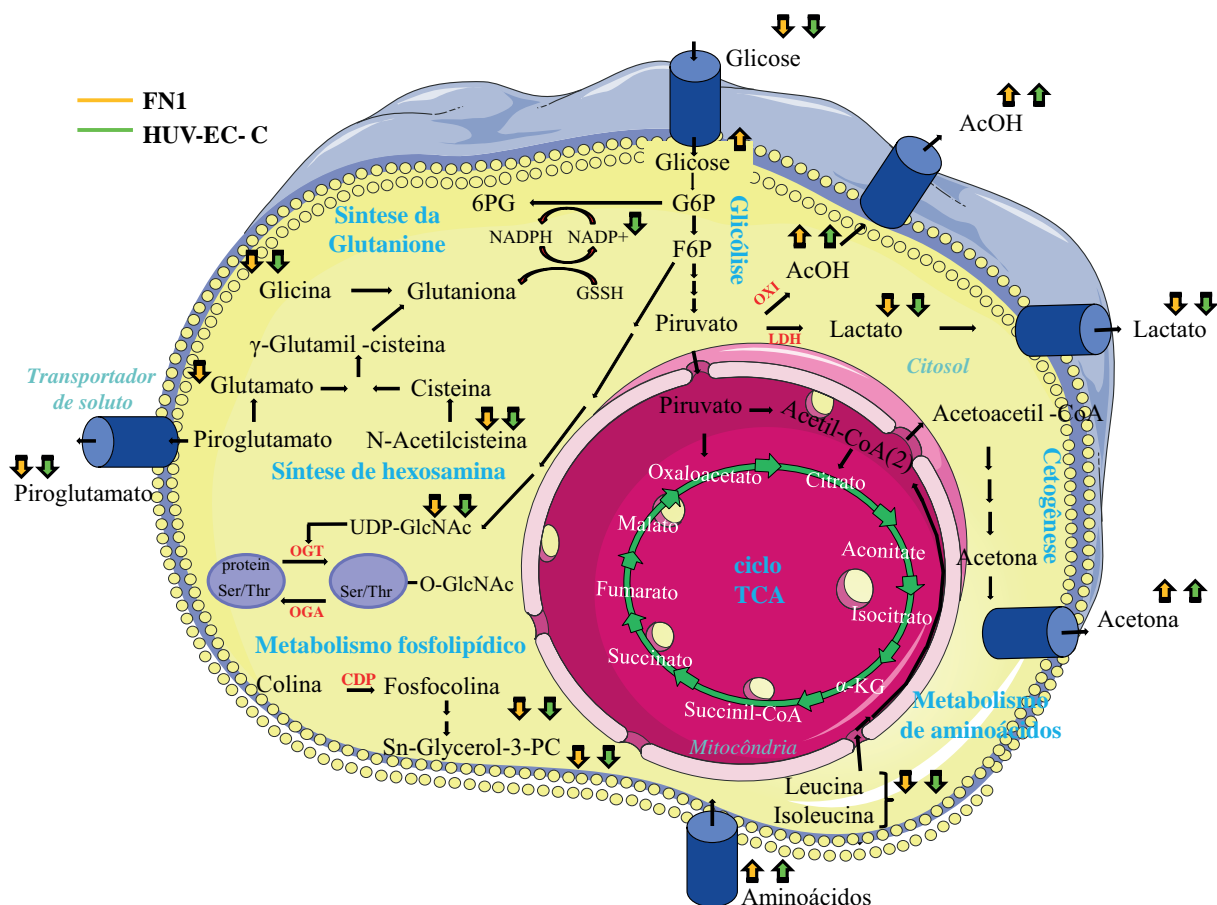


Figura 43: Resumo das vias metabólicas identificadas que estão mudando após o tratamento com as bio-AgNPs dependentes da dose e tempo. Tendências de aumento e diminuição dos níveis metabólicos descritos nas Figuras 40 e 41 são representadas com setas para cima e para baixo para as linhagens FN1 (seta laranja) e HUV-EC-C (seta verde). Abreviação: OXI para oxidação, LDH para lactate desidrogenase, G6P para glicose-6-fosfato, 6PG para 6-fosfogluconolacton, F6P para fructose-6-fosfato, OGT e OGA enzimas para O-GlcNAc transferasa e O-GlcNAcase, CDP para Citidina 5'-difosfocolina, e proteína nuclear citoplasmática ilustrado em púrpura.

4.3.4.2 Células RAW 264.7

Da mesma forma que para o caso das células das linhagens FN1 e HUV-E-C, apesar de não serem evidenciadas provas diretas dos níveis do piruvato, podemos acessar o metabolismo glicolítico das células da linhagem RAW 264.7 através dos produtos derivados desta molécula. Estatisticamente, através das análises dos *VIP scores*, a glicose dos meios de cultura não foi identificada como um indicador responsável pelas tendências de agrupamento, indicando que os macrófagos tratados com as bio-AgNPs estão consumindo moléculas de glicose do meio de cultura na mesma proporção que o caso controle durante os 24 e 48 horas de exposição. Portanto, as células RAW 264.7 expostas com as bio-AgNPs

poderiam exibir, aproximadamente, o mesmo consumo de glicose e produção de piruvato em relação ao caso controle, sugerindo que não houve alteração significativa da atividade da glicólise. Por outro lado, como descrito anteriormente, a molécula de piruvato é o produto final da atividade glicolítica divergindo para diferentes vias para formar outras moléculas, tais como, o lactato através fermentação láctea, alanina pela reação ALT (transferência de alanina amino), acetil-CoA por descarboxilação oxidativa, entre outros (Gray et al., 2014). Para 24 e 48 horas de incubação destas células, uma diminuição nos níveis de produção dentro do citosol do lactato e alanina pôde ser observado (Figura 42-A) conforme aumenta-se a concentração das bio-AgNPs. Além disso, a excreção de lactato para os meios de cultura aumentou ligeiramente ou quase não mudou em relação ao caso para as doses de 25, 50 e 75 μM , mas diminuindo para 100 μM . Estes resultados sugerem que a exposição dos macrófagos com as bio-AgNPs induz a desaceleração das vias anaeróbicas, provavelmente através da obstrução da enzima LDH e das reações ALT para a produção de lactato e alanina a partir do piruvato. Uma diminuição dos níveis de lactato e alanina está em concordância com estudos prévios em células cancerígenas após a exposição com quercetina (Guerra et al., 2018) que, tipicamente, apresentam uma atividade glicolítica elevada, similar a dos macrófagos M1 pró-inflamatórios estimulados por LPS e IFN- γ (Mendes et al., 2019).

A exposição às bio-AgNPs, parece ter um efeito distinto na via TCA ocorrendo dentro da matriz mitocondrial, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 44. A exposição das células RAW 264.7 mostrou uma tendência de elevação dos níveis de excreção do citrato em relação às células controle para 24 e 48 horas de incubação nos meios de cultura. A produção elevada de acetil-CoA, a partir da descarboxilação do piruvato, diverge no ciclo TCA de forma a doar seu grupo acetil de quatro carbonos para o citrato a partir de uma reação de condensação com o oxaloacetato e, assim, sendo responsável pela acumulação detectada desta molécula nos resultados. Portanto, é possível postular que as nanopartículas de prata induzem os macrófagos a seguirem pela via aeróbica do TCA, potencializando esta através do ciclo piruvato/Acetil-CoA/citrato (Guay et al., 2007). Este aumento nos níveis do citrato é também associado com macrófagos M1 pró-inflamatórios ativados por LPS e IFN- γ (Mendes et al., 2019) que ocorre devido a duas principais alterações transcricionais, a desaceleração do IDH (Jha et al., 2015) e a aceleração do portador de citrato mitocondrial CIC (Infantino et al., 2014) que leva à acumulação do

citrato no interior das mitocôndrias.

Como mostrado na Figura 42-B, os níveis dos aminoácidos leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina e triptofano apresentam concentrações que aumentam nos meios de cultura em relação ao caso controle, principalmente quando as células são expostas as bio-AgNPs por um período longo de tempo. É razoável assumir que as nanopartículas de prata estão induzindo as células de macrófagos a sintetizarem quatro desses aminoácidos a partir do piruvato e do fosfoenolpiruvato com origens glicolítica, e outros dois aminoácidos através da rota piruvato/oxaloacetato/aspartato, todos excretados pelas células para os respectivos meios de cultura. Este resultado sugere que as nanopartículas de prata não promovem o uso de aminoácidos do meio de cultura para produzir intermediários do ciclo TCA.

A colina é um componente essencial da membrana fosfolipídica das células que atua como a intersecção de múltiplas vias metabólicas que podem ser divididas em categorias como: metabolismo de metila, síntese fosfolipídica, metabólitos derivados da dieta, dentre outros (Mazi et al., 2019). A exposição das células da linhagem RAW 267.4 com as bio-AgNPs por 24 e 48 horas de incubação parece induzir modificações nessas vias metabólicas, conforme sugere o aumento detectado na excreção da colina para os meios de cultura (Figura 42-B), logo indicando uma redução no consumo da colina pelas células de macrófagos. Esses resultados são discutidos nos seguintes parágrafos. No metabolismo de metila, (Ueland et al 2005), betaine é produzido através da colina oxidase, que é metabolizada para glicina. A creatina atua como uma importante fonte de energia para as células que têm altas demandas energéticas e podem ser sintetizadas através da via Glicina-GAA (Brosnan et al., 2009). Reduções nos níveis da betaine em relação às células controle foram observados conforme mostra a Figura 42-A, indicando a desaceleração da via metabólica colina/betaine. Neste mesmo sentido, a função osmorregulatório que desempenha a betaine para que as células mantenham seus respectivos volumes (Ratriyanto e Mosenthin, 2018) poderia estar sendo desacelerada, o que estaria de acordo com o as mudanças morfológicas observadas após a exposição com as bio-AgNPs, conforme mostrado em nossos resultados da Figura 28-B. A glicina e a creatina tiveram seus respectivos níveis reduzidos para as células tratadas em relação ao caso controle, como mostrado na Figura 42-A. Este comportamento poderia estar relacionado com um redirecionamento metabólico que leva a baixar o consumo de colina pelas células, causando assim a desace-

leração da via creatina/glicina observada em nossos dados. Esses resultados indicam que as bio-AgNPs estão forçando as células a uma situação de alta demanda energética através de outra via metabólica quando as taxas de ATP utilizadas pelas células sobrecarregam sua produção. Decrescimentos nos níveis da creatina para macrófagos ativados por LPS também foram observados após a exposição ao PG-FMN, sugerindo uma deterioração da conversão mediada por CK de fosfocreatina para creatina (Cicuéndez et al., 2020).

O metabolismo fosfolipídico das células desta linhagem também é afetado após a exposição com as bio-AgNPs por 24 e 48 horas de incubação, sugerindo modificações nas membranas e uma desaceleração nas taxas de proliferação celular como observado em nossos resultados sumarizados pela Figura 27 e 28. Atribuímos essas mudanças devido a tendência observada de aumento nos níveis da fosfocolina e Sn-Glycerol-3-PC em comparação com as células controle (Figura 42-A). Estes metabólitos são sintetizados a partir da colina através da via CDP-colina (Chang e Carman, 2008) e estão associados com os metabólitos essenciais para a integridade da membrana celular (van der Veen et al., 2017). Estudos prévios têm reportado danos diretos nas membranas das células de macrófagos induzidos por íons de prata que ocorrem independentemente da citotoxicidade provocada pela captação celular de átomos de prata (Carrola et al., 2016). Neste sentido, existe a possibilidade que nossas nanopartículas de prata estão sendo dissolvidas em íons de prata dentro das células, afetando diferentes organelas como, por exemplo, as mitocôndrias.

A molécula de trimetilamina (TMA) é um componente amino sintetizado a partir da colina através da enzima *gut microbial Choline-TMA lyase* e que, subsequentemente, é oxidada para trimetilamina N-oxide (TMAO) via flavina-monooxigenasa hepática de mamíferos (FMO) (Lakshmi et al., 2021). Como pode ser observado na Figura 42-A, os níveis do endometaboloma referentes ao TMAO diminuem para os macrófagos tratados com bio-AgNPs em comparação com as células controle em ambos os tempos de incubação, apresentando uma diminuição mais acentuada para 48 horas. Uma possível hipótese para explicar esta variação poderia ser a desaceleração da conversão colina/TMAO, que é consistente com a redução do consumo da colina pelas células da linhagem RAW 264.7 discutido anteriormente. Sabe-se que o incremento nos níveis de TMAO induz reações inflamatórias em macrófagos conforme observado no caso da doença de aterosclerose (Hakhamaneshi et al., 2021), enquanto que sua redução pode aumentar a estabilidade da placa carotídea aterosclerótica através da promoção da polarização de macrófagos M2 e a es-

ferocitose (Shi et al., 2021). Portanto, é razoável postular que a redução nos níveis do TMAO em células macrófagos induzidas pela citotoxicidade das nanopartículas de prata poderia ajudar em outras doenças inflamatórias crônicas, bem como no processo de cicatrização de feridas. A tendência identificada para o piroglutamato foi a de diminuir seus

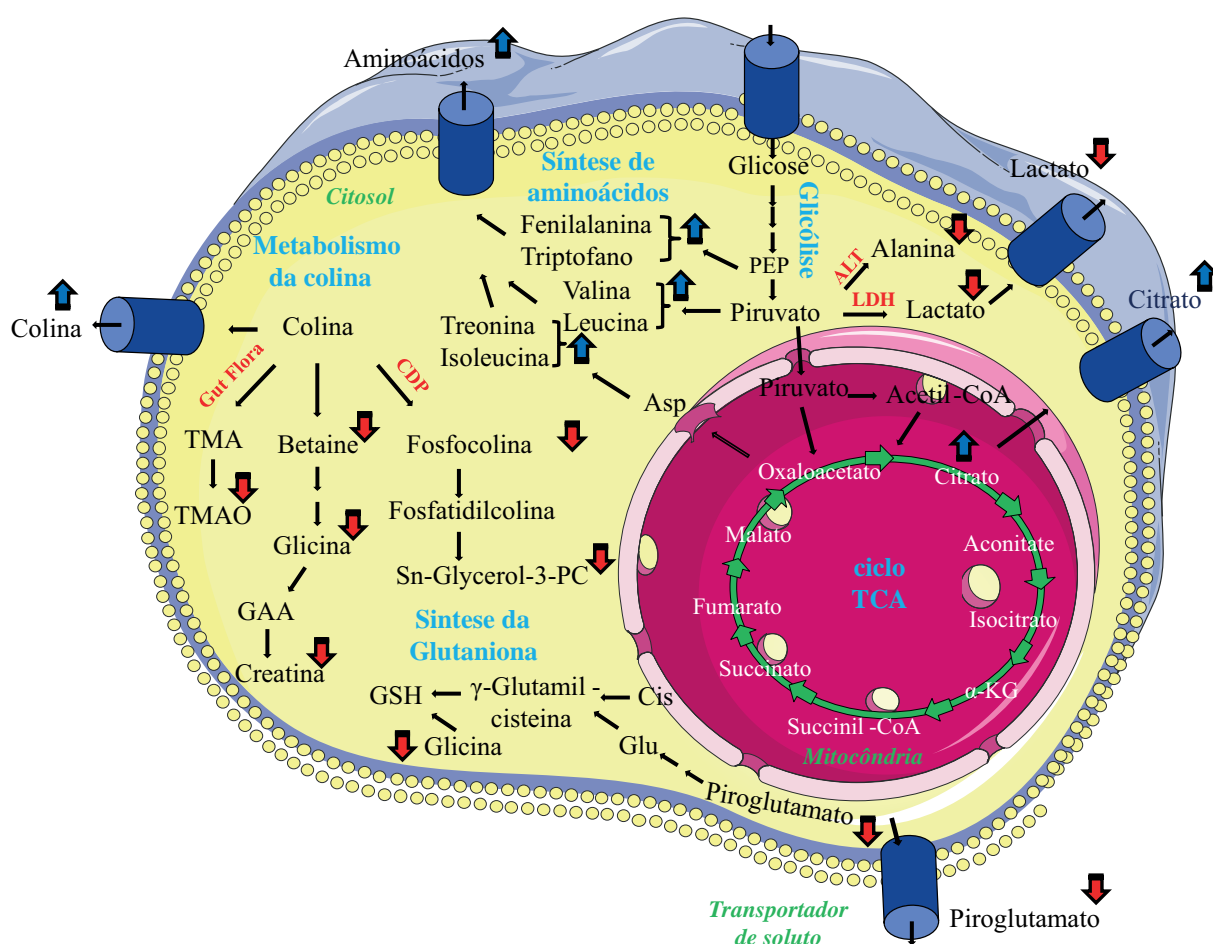


Figura 44: Resumo das vias metabólicas identificadas que estão mudando com os tratamentos da bio-AgNPs dependentes da dose e tempo para RAW 264.7. Tendências de aumento e diminuição dos níveis metabólitos descritos na Figura 42 são representadas com setas para cima (seta azul) e para baixo (seta vermelha). Abreviaturas: α -KG para α -ketoglutarato, CDP para citidina 5-difosfocolina, PEP para fosfoenolpiruvato, ALT para alanina aminotransferase, LDH para lactato desidrogenase e GSH para glutatona.

respectivos níveis quando as células da linhagem RAW 264.7 são expostas às bio-AgNPs por 24 e 48 horas de incubação. Como descrito anteriormente, esta molécula é excretada pelas células para o meio de cultura sendo um intermediário na biossíntese da glutatona, que desempenha uma função importante na regeneração de grupos SH oxidados, por exemplo, pelas ROS (Forman et al., 2009). Se menos piroglutamato está sendo excretado pelas células para o meio de cultura em relação ao controle, então é possível que as células tratadas estejam dirigindo seu metabolismo para uma elevação na produção de agentes

antioxidantes como as glutathiona. As evidências para este mecanismo que identificamos e quantificamos aqui nos permitem inferir que as células estão sofrendo diferentes níveis de estresse oxidativo induzido pelas bio-AgNPs de forma dose e tempo dependentes.

CAPITULO 5

“A man should look for what is, and not for what he thinks should be ”

A. Einstein

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, investigamos as características morfo-elétricas de nanopartículas de prata em DMEM alta glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino, assim como o efeito citotóxico e as mudanças metabólicas produzidas em células das linhagens FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7 tratadas através de diferentes doses e tempos de incubação. Para atingir nossos objetivos, ensaios de SAXS, DLS, Absorbância UV-vis e Potencial zeta foram utilizados para caracterizar as nanopartículas de prata, entretanto, os aspectos citotóxicos e as mudanças metabólicas foram estudadas com ensaios de dinâmica de crescimento, MTT, viabilidade celular e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons com alta-resolução. Em geral, nossos resultados de caracterização mostraram que a incubação das AgNPs no meio de cultura suplementado, isto é, 10% SFB+DMEM estabelece uma forte interação entre as componentes inorgânica e orgânica que resulta na formação de coronas biomoleculares ao redor das nanopartículas, formando assim um nova entidade estável no tempo que apresenta variações no tamanho do complexo bio-AgNPs gerado em função das concentrações de prata, porém não de seu núcleo duro. Abordando os aspectos de citotoxicidade das bio-AgNPs em 24 e 48 horas de incubação, importantes mudanças foram observadas nas linhagens FN1/HUV-EC-C/RAW 264.7, com um decréscimo progressivo das taxas de expansão das células, acompanhado por mudanças morfológicas e nas respectivas áreas celulares que diminuem de tamanho, assim como um decréscimo sistemático na população de células viáveis quando o número de nanopartículas aumenta e o diâmetro da corona biomolecular decresce na solução do meio de cultura. Adicionalmente, através destes dados pode-se inferir que a linhagem celular RAW 264.7 se mostrou mais resistente a estas mudanças em relação às células das linhagens FN1 e HUV-EC-C. Zonas de citotoxicidade chamadas sub-letal e letal foram obtidas à partir das análises dos resultados de viabilidade celular e associadas com as mudanças metabólicas dependentes da dose e do tempo de incubação com as estruturas bio-AgNPs, sendo estas identificadas nas amostras do extrato celular (endometabolomas) e em meio de cultura (exometabolomas) das três linhagens celulares: FN1, HUV-EC-C e RAW 264.7. Nossas análises do endo- e exo-metaboloma revelaram que algumas vias

metabólicas fundamentais das células foram ativadas como resposta aos tratamentos com as bio-AgNPs.

Para as linhagens celulares FN1 e HUV-EC-C, a via metabólica da glicólise foi acelerada consumindo mais moléculas de glicose, no entanto, houve um desperdício das moléculas de piruvato energético que se oxidam para formar AcOH que apresentou níveis mais elevados nas células tratadas conforme mostrado em nossos resultados. A via cetogênica é acelerada uma vez que se observou um excesso de acetona nas amostras. Além disso, o excesso de moléculas de creatina desfosforiladas detectado sugere as tentativas das células em repor a energia temporal e espacial no ambiente celular. Aminoácidos detectados no endometaboloma das células tratadas com as bio-AgNPs forneceram evidências de que o mecanismo de degradação proteica pode ser ativado para produzir piruvato e acetil-CoA, enquanto aqueles encontrados nas amostras de meio de cultura parecem sugerir a desaceleração do metabolismo dos aminoácidos para produzir intermediários do TCA. O piroglutamato, N-Acetilcisteína e NADP⁺ são intermediários da biossíntese da glutathione, um importante agente antioxidante. Essas moléculas estão mudando consistentemente como revelou os dados de endo- e exo-metaboloma de ambas as linhagens celulares. Esse comportamento sugere que as células estão respondendo ao estresse oxidativo causado pelas bio-AgNPs, aumentando a síntese da glutathione. A diminuição dos níveis do formate nos exo-metabolomas corroborou com esta hipótese de que o estresse oxidativo nas células tratadas está afetando a função mitocondrial. O metabolismo fosfolipídico é desacelerado nas células tratadas por 24 e 48 horas conforme sugere a diminuição nos níveis do O-fosfocolina e Sn-Glycero-3-PC nos dados de endo-metaboloma, sinalizando assim uma redução da taxa de proliferação das células ou a elevação na taxa de mortalidade celular, resultados estes que concordaram com aqueles de citotoxicidade. Nossa análise também revelou, pela primeira vez, que o UDP-GlcNAc excretado por ambas as linhagens de células, está mudando seus níveis nas células tratadas quando comparadas com as controle. Como este metabólito desempenha uma função importante na modificação de proteínas nucleocitoplasmáticas, os dados sugerem que o tratamento com as bio-AgNPs pode impactar diretamente nesse tipo de proteína, em princípio, reduzindo tais modificações.

Para a linhagem celular RAW 264.7 a atividade glicolítica de todos os grupos de células, tratadas e não tratadas com as bio-AgNPs, permaneceu inalterada. As células

provavelmente estão produzindo piruvato na mesma proporção, no entanto, a indicação de que apenas as células tratadas com as bio-AgNPs apresentam um excesso de citrato no ambiente celular, como mostrado nos dados de exo-metaboloma, sugere uma aceleração do ciclo TCA que depende diretamente da dose e do tempo de exposição com a prata. Adicionalmente, através dos baixos níveis de excreção detectados para o lactato e a alanina, podemos argumentar que as células tratadas com as bio-AgNPs parecem escolher o metabolismo aeróbico em detrimento do anaeróbico para produzir sua energia, e este fato apoia nossa conclusão sobre a tendência de aceleração do TCA com o tratamento. Os dados também nos permitem concluir que as células tratadas estão auto-regulando o metabolismo dos aminoácidos para equilibrar o TCA, elevando a produção de quatro aminoácidos específicos, valina, leucina, fenilalanina e triptofano, que foram detectados no meio de cultura como sub-produtos do piruvato glicólico (Val, Leu) e e fosfoenolpiruvato (Phe, Trp) ao invés da absorção desses aminoácidos diretamente do meio de cultura. O metabolismo da colina nas células tratadas com as bio-AgNPs foi desacelerado devido a uma redução geral observada para os subprodutos produzidos nesta via, a betaine e, posteriormente, a glicina que foram detectadas em baixos níveis nos endo-metabolomas. Conseqüentemente, a produção de creatina, uma importante fonte energética para as células, também está sendo afetado, como observado no mesmo metaboloma. Esta conclusão é apoiada pelo fato de que uma vez que o metabolismo da colina está desacelerando, ou mesmo sendo bloqueado, a molécula de trimetilamina N-óxido (TMAO) sintetizada da colina, apresenta seus níveis de concentração diminuídos quando as células são tratadas com as bio-AgNPs. Finalmente, da mesma forma que para as outras duas linhagens, a exposição das células da linhagem RAW 264.7 com as bio-AgNPs desacelerou o metabolismo fosfolipídico mostrando níveis de fosfocolina e Sn-Glycerol-3-PC reduzidos, assim como sugere que as células estão respondendo a um estresse oxidativo causado pelas bio-AgNPs que aumenta a síntese da glutatona, conforme sugeriu a redução dos níveis de piroglutamato detectados em nossos resultados.

Como queríamos demonstrar, a metabolômica baseada em ^1H -RMN, combinada com ensaios de viabilidade padrões, provaram que a ação *in vitro* da citotoxicidade inerente às bio-AgNPs podem induzir alterações no metabolismo, na morfologia e nas taxas de proliferação nas células que participam no processo de reparo tecidual, através de parâmetros que dependem da dose e do tempo. Em princípio, esses parâmetros podem

ser ajustados para obter o controle de alguns eventos bioquímicos básicos ou de viabilidade celular como, por exemplo, a atividade mitocondrial, produção de agentes antioxidantes e taxas de proliferação celular dentre outros, podendo assim impactar positivamente, ou mesmo negativamente, nos processos de cicatrização de feridas quando pensamos em uma abordagem multi-escala. Portanto, temos como perspectiva fazer um estudo prospectivo de tratamento com nanopartículas de prata em cultura de tecidos, ou peles artificiais, desenvolvidos através de técnicas de cultivo que empregam a cultura simultânea de duas linhagens celulares diferentes compartilhando do mesmo meio nutricional, mas aderidas em substratos que não permitem o contato físico entre elas. Eventualmente, estes tecidos podem ser estudados em sua forma natural ou após passarem por um processo de injúria provocada artificialmente.

REFERÊNCIAS

1. Aurica Precupas, Anca RL, Andreea N, Daniel GA, Vlad TP. 2022. Bovine hemoglobin thermal stability in the presence of naringenin: Calorimetric, spectroscopic and molecular modeling studies, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 361, 119617, ISSN 0167-7322.
2. Almatroudi A. 2020. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sci.* 15(1):819–39
3. Arno AI, Gauglitz GG, Barret JP, Jeschke MG. 2014. Up-to-date approach to manage keloids and hypertrophic scars: a useful guide. *Burns.* 40(7):1255–66
4. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 179(2):93–100
5. Bacchi PS, Bloise AC, Bustos SO, Zimmermann L, Chammas R, Rabbani SR. 2014. Metabolism under hypoxia in Tm1 murine melanoma cells is affected by the presence of galectin-3, a metabolomics approach. *Springerplus.* 3:470
6. Bagabir R, Byers RJ, Chaudhry IH, Müller W, Paus R, Bayat A. 2012. Site-specific immunophenotyping of keloid disease demonstrates immune upregulation and the presence of lymphoid aggregates. *Br. J. Dermatol.* 167(5):1053–66
7. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, et al. 2018. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics.* 14(11):152
8. Berman B, Maderal A, Raphael B. 2017. Keloids and hypertrophic scars: pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatol. Surg.* 43 Suppl 1:S3–18
9. Bloise AC, Dos Santos JA, de Brito IV, Bassaneze V, Gomes LF, Alencar AM. 2020. Discriminating aspects of global metabolism of neonatal cardiomyocytes from wild type and KO-CSR3 rats using proton magnetic resonance spectroscopy of culture media samples. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 56(8):604–13
10. Bromke MA. 2013. Amino Acid biosynthesis pathways in diatoms. *Metabolites.* 3(2):294–311

11. Brosnan JT, Wijekoon EP, Warford-Woolgar L, Trottier NL, Brosnan ME, et al. 2009. Creatine synthesis is a major metabolic process in neonatal piglets and has important implications for amino acid metabolism and methyl balance. *J. Nutr.* 139(7):1292–97
12. Burton C, Ma Y. 2019. Current trends in cancer biomarker discovery using urinary metabolomics: achievements and new challenges. *Curr. Med. Chem.* 26(1):5–28
13. Butzelaar L, Schooneman DPM, Soykan EA, Talhout W, Ulrich MMW, et al. 2016. Inhibited early immunologic response is associated with hypertrophic scarring. *Exp. Dermatol.* 25(10):797–804
14. Bux S, Madaree A. 2010. Keloids show regional distribution of proliferative and degenerate connective tissue elements. *Cells Tissues Organs (Print)*. 191(3):213–34
15. Brereton RG, Lloyd GR. 2014. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemometrics*, 28: 213-225.
16. Barker M, Rayens W. 2003, Partial least squares for discrimination. *J. Chemometrics*, 17: 166-173.
17. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2002. *Biochemistry* 5th edition, New York, W H Freeman.
18. Buxton, Richard B. 2002. *Introduction to functional magnetic resonance imaging*. Cambridge University Press. p. 136. ISBN .
19. Bonin Claudio. 2011. *Estudio de Cuasi-invariantes Dipolares en Cristales Líquidos Termotrópicos por Coherencias Cuánticas Múltiples en Resonancia Magnética Nuclear*.
20. Bulavinets T, Varyshchuk V, Yaremchuk I, Bobitski Y. 2018. Design and Synthesis of Silver Nanoparticles with Different Shapes Under the Influence of Photon Flows. *Springer Proceedings in Physics*, vol 210. Springer, Cham.
21. Beer. 1852. Determination of the absorption of red light in colored liquids. In J. C. Poggendorff (Ed.), *Annalen der physik und chemie* (pp. 78–88). J.A. Barth.

22. Bhomia R, Trivedi V, Coleman NJ, Mitchell JC. 2016. The thermal and storage stability of bovine haemoglobin by ultraviolet-visible and circular dichroism spectroscopies *J. Pharm. Anal.*, 6 (4) , pp. 242-248,
23. Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438(7070):932–36
24. Carrola J, Bastos V, Jarak I, Oliveira-Silva R, Malheiro E, et al. 2016. Metabolomics of silver nanoparticles toxicity in HaCaT cells: structure-activity relationships and role of ionic silver and oxidative stress. *Nanotoxicology*. 10(8):1105–17
25. Carrola J, Duarte N, Florindo P, Henriques S, da Silva G, et al. 2020. Metabolism of N-ethylhexedrone and buphedrone: An in vivo study in mice using HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1159:122340
26. Castiglioni S, Caspani C, Cazzaniga A, Maier JA. 2014. Short- and long-term effects of silver nanoparticles on human microvascular endothelial cells. *World J. Biol. Chem.* 5(4):457–64
27. Carlos Bloise JA. 2002 . *Estudo de Eletrólitos por Ressonância Magnética (Tese de Doutorado)*; Universidade de São Carlos: São Carlos.
28. Carlos Bloise JA. 2018. *Principles and concepts on NMR with applications in spectroscopy*; Universidade de São Paulo: São Paulo.
29. Carter AH. 2001. *Classical and Statistical Thermodynamics* Prentice-Hall, Inc. New Jersey. ISBN 0-13-779208-5.
30. Cantor CR, Schimmel PR. 1980. *Part II: Techniques for study of biological structure and function*. New York: W.H. Freeman and Company.
31. Chang Y-F, Carman GM. 2008. CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Lipid Res.* 47(5):333–39
32. Chen L, Wang J, Li S, Yu Z, Liu B, et al. 2019. The clinical dynamic changes of macrophage phenotype and function in different stages of human wound healing and hypertrophic scar formation. *Int. Wound J.* 16(2):360–69
33. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, et al. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 46(W1):W486–94

34. Cicuéndez M, Fernandes M, Ayán-Varela M, Oliveira H, Feito MJ, et al. 2020. Macrophage inflammatory and metabolic responses to graphene-based nanomaterials differing in size and functionalization. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 186:110709
35. Cui T, Ma Y, Yang J-Y, Liu S, Wang Z, et al. 2021. Protein corona-guided tumor targeting therapy via the surface modulation of low molecular weight PEG. *Nanoscale*. 13(11):5883–91
36. De Paoli SH, Diduch LL, Tegegn TZ, Orecna M, Strader MB, et al. 2014. The effect of protein corona composition on the interaction of carbon nanotubes with human blood platelets. *Biomaterials*. 35(24):6182–94
37. Dixon RA, Gang DR, Charlton AJ, Fiehn O, Kuiper HA, et al. 2006. Applications of metabolomics in agriculture. *J. Agric. Food Chem*. 54(24):8984–94
38. Dikshit PK, Kumar J, Das A.K, Sadhu S, Sharma S, et al. 2021. Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11, 902.
39. Donsker M D. 1952. Justification and extension of Doob's heuristic approach to the Kolmogorov–Smirnov theorems». *Annals of Mathematical Statistics*. 23: 277–281.
40. Duran N, Silvia G, Oswaldo LA. *Nanotoxicology: Materials, Methodologies, and Assessments*. Ed. Nelson Duran, Silvia Guterres, and Oswaldo L. Alves. New York: Springer, 2014. Print.
41. Dykman LA, Khlebtsov NG. 2011. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae*. 3(2):34–55
42. Eisberg RM, Resnick R. 1979. *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos e Partículas*, Editora Campus.
43. Fiehn O. 2002. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol*. 48(1–2):155–71
44. Feigin LA, Svergun D I. 1987. *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*, Plenum Press, New York, pp. 335.

45. Florin E, Kjellander R, Eriksson JC. 1984. Salt effects on the cloud point of the poly(ethylene oxide) + water system *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* , 80, 2889–2910
46. Fiocruz AEA, Guimarães ACR. 2017. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2 Capítulo 5: Cultivo celular.* Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio.
47. Fordellone, Mario and Bellincontro, Andrea and Mencarelli, Fabio. 2018. Partial least squares discriminant analysis: A dimensionality reduction method to classify hyperspectral data.
48. Franck J. 1996. Elementary processes of photochemical reactions. *Transactions of the Faraday Society*, 21 0536-0542.
49. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30(1–2):1–12
50. Franková J, Pivodová V, Vágnerová H, Juráňová J, Ulrichová J. 2016. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 14(2):e137-42
51. Fratoddi I. 2017. Hydrophobic and hydrophilic au and ag nanoparticles. breakthroughs and perspectives. *Nanomaterials (Basel)*. 8(1):
52. García-Álvarez R, Hadjidemetriou M, Sánchez-Iglesias A, Liz-Marzán LM, Kostarelos K. 2018. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale*. 10(3):1256–64
53. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. 2011. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol. Med.* 17(1–2):113–25
54. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. 2011. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol. Med.* 17(1–2):113–25.

55. Garcia P., Prymak O, Grasmik V, Pappert K, Wlysses W, Otubo L, et al. 2019. An in situ SAXS investigation of the formation of silver nanoparticles and bimetallic silver–gold nanoparticles in controlled wet-chemical reduction synthesis. *Nanoscale Advances*.
56. Gil VM, Geraldes C. 1987. *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações*. Fundamento Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1012.
57. Glatter O, Kratky O. 1982. Editors. *Small Angle X-ray Scattering*. London: Academic Press.
58. González-García LE, MacGregor MN, Visalakshan RM, Lazarian A, Cavallaro AA, et al. 2022. Nanoparticles surface chemistry influence on protein corona composition and inflammatory responses. *Nanomaterials (Basel)*. 12(4):
59. Gottfries J, Blennow K, Wallin A, Gottfries CG. 1995. Diagnosis of dementias using partial least squares discriminant analysis. *Dementia*. 6(2):83–88
60. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. 2014. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell. Mol. Life Sci*. 71(14):2577–2604
61. Guay C, Madiraju SRM, Aumais A, Joly E, Prentki M. 2007. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem*. 282(49):35657–65
62. Guerra AR, Duarte MF, Duarte IF. 2018. Targeting Tumor Metabolism with Plant-Derived Natural Products: Emerging Trends in Cancer Therapy. *J. Agric. Food Chem*. 66(41):10663–85
63. Hakhamaneshi MS, Abdolahi A, Vahabzadeh Z, Abdi M, Andalibi P. 2021. Toll-Like Receptor 4: A Macrophage Cell Surface Receptor Is Activated By Trimethylamine-N-Oxide. *Cell J*. 23(5):516–22
64. Hansen U, Thünemann AF. 2015. Characterization of silver nanoparticles in cell culture medium containing fetal bovine serum. *Langmuir*. 31(24):6842–52
65. Hart GW, Housley MP, Slawson C. 2007. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. 446(7139):1017–22

66. Haase A, Tentschert J, Jungnickel H, Graf P, Manton A, et al. 2011. Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular responses. *Journal of Physics: Conference Series* 304- 012030.
67. Helmlinger J, Sengstock, Christina GH, et al. 2016. Silver nanoparticles with different size and shape: Equal cytotoxicity, but different antibacterial effect. *RSC Adv.*
68. Heckler CE. 2005. Applied multivariate statistical analysis: applied multivariate statistical analysis. *Technometrics* 47(4):517–517.
69. Hiemenz P C. 1986. Principles of colloid and surface chemistry , New York: Marcel Dekker. 815 p.
70. Hulkoti NI, Taranath TC. 2017. Influence of physico-chemical parameters on the fabrication of silver nanoparticles using *Petrea volubilis* L. stem broth and its antimicrobial efficacy. *Int J Pharm Sci Drug Res.* 2017;9:72–8.
71. Huang K, Hu Y, Yu C, Boerhan R., Jiang G. 2016. Charged surface groups of nanoparticles and the adsorbed proteins codetermine the fate of nanoparticles upon interacting with cells. *RSC Adv.*, 2016,6, 58315-58324
72. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. 2017. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* 18(7):
73. Houdas Y. 1991. [Doppler, Buys-Ballot, Fizeau. Historical note on the discovery of the Doppler's effect]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 40(4):209–13
74. Huang C, Akaishi S, Hyakusoku H, Ogawa R. 2014. Are keloid and hypertrophic scar different forms of the same disorder? A fibroproliferative skin disorder hypothesis based on keloid findings. *Int. Wound J.* 11(5):517–22
75. Hulkoti NI, Taranath TC. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 121:474–83
76. Infantino V, Iacobazzi V, Menga A, Avantaggiati ML, Palmieri F. 2014. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF- α and IFN γ -triggered inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1839(11):1217–25

77. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* 19(11):1518–20
78. Jaiswal VD, Dongre PM. 2020. Biophysical interactions between silver nanoparticle-albumin interface and curcumin. *J. Pharm. Anal.* 10(2):164–77
79. Jafelicci M.J, Laudemir CV. 1999. Artigo: O Mundo dos Coloides. *Quimica Nova na Escola.* n. 9.
80. Jackson, John David. 1975. Magnetic fields of a Localized Current Distribution, Magnetic Moment. *Classical Electrodynamics.* 2. ISBN .
81. James Keeler. 2013. *Understanding NMR Spectroscopy.*
82. Jackson JD, 1998. *Classical Electrodynamics.* John Wiley and Sons, New York, 3rd ed.
83. Jelonek K, Widłak P. 2018. Metabolome-based biomarkers: their potential role in the early detection of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn).* 22(3):135–40
84. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, et al. 2015. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 42(3):419–30
85. Jin Q, Gui L, Niu F, Yu B, Lauda N, et al. 2018. Macrophages in keloid are potent at promoting the differentiation and function of regulatory T cells. *Exp. Cell Res.* 362(2):472–76
86. Kalishwaralal K, Banumathi E, Ram Kumar Pandian S, Deepak V, Muniyandi J, et al. 2009. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 73(1):51–57
87. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Ishiguro-Watanabe M, Tanabe M. 2021. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res.* 49(D1):D545–51
88. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D457-62

89. Karahalil B. 2016. Overview of systems biology and omics technologies. *Curr. Med. Chem.* 23(37):4221–30
90. Karmali PP, Simberg D. 2011. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8(3):343–57
91. Kalinowski P, Fidler F. 2010. Interpreting significance: the differences between statistical significance, effect size, and practical importance. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 10(1): 50-4.
92. Kirby B.J. 2010. *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*. Cambridge University Press. ISBN 987-0-521-11903-0.
93. Knetsch ML. 2013. Evolution of current and future concept of biocompatibility testing. In S. Dumitriu, V. Popa, *Polymeric Biomaterials -Structure and Function* .Third ed., Vol. 1, pp. 377-415.
94. Kubo R. 1966. The fluctuation-dissipation theorem. *Rep. Prog. Phys.* 29, 255–284.
95. Kiya K, Kubo T, Kawai K, Matsuzaki S, Maeda D, et al. 2017. Endothelial cell-derived endothelin-1 is involved in abnormal scar formation by dermal fibroblasts through RhoA/Rho-kinase pathway. *Exp. Dermatol.* 26(8):705–12
96. Koczur KM, Mourdikoudis S, Polavarapu L, Skrabalak SE. 2015. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Trans.* 44(41):17883–905
97. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. 2018. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front. Physiol.* 9:419
98. Kurose H. 2021. Cardiac fibrosis and fibroblasts. *Cells.* 10(7):
99. Kwan KHL, Liu X, To MKT, Yeung KWK, Ho C, Wong KKY. 2011. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine.* 7(4):497–504

100. Lakshmi GBVS, Yadav AK, Mehlawat N, Jalandra R, Solanki PR, Kumar A. 2021. Gut microbiota derived trimethylamine N-oxide (TMAO) detection through molecularly imprinted polymer based sensor. *Sci. Rep.* 11(1):1338
101. Lategan KL, Walters CR, Pool EJ. 2019. The effects of silver nanoparticles on RAW 264.7. Macrophages and human whole blood cell cultures. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 24:347–65
102. Lee HJ, Jang YJ. 2018. Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids. *Int. J. Mol. Sci.* 19(3):
103. Le Guennec A, Tayyari F, Edison AS. 2017. Alternatives to Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presat and Carr-Purcell-Meiboom-Gill Presat for NMR-Based Metabolomics. *Anal. Chem.* 89(17):8582–88
104. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. 2007. Metabonomics in pharmaceutical R and D. *FEBS J.* 274(5):1140–51
105. Liu J, Semiz S, van der Lee SJ, van der Spek A, Verhoeven A, et al. 2017a. Metabolomics based markers predict type 2 diabetes in a 14-year follow-up study. *Metabolomics.* 13(9):104
106. Liu K, Pi F, Zhang H, Ji J, Xia S, et al. 2017b. Metabolomics Analysis To Evaluate the Anti-Inflammatory Effects of Polyphenols: Glabridin Reversed Metabolism Change Caused by LPS in RAW 264.7 Cells. *J. Agric. Food Chem.* 65(29):6070–79
107. Liu X, Lee P-Y, Ho C-M, Lui VCH, Chen Y, et al. 2010. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem.* 5(3):468–75
108. Li T, Senesi AJ, Lee B. 2016. Small Angle X-ray Scattering for Nanoparticle Research. *Chem. Rev.* 116(18):11128–80
109. Li X, Wang Y, Yuan B, Yang H, Qiao L. 2017. Status of M1 and M2 type macrophages in keloid. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 10(11):11098–105
110. Li Z, Shen W, Liu X, Liu R. 2017. Efficient unimolecular photoinitiators for simultaneous hybrid thiol-yne-epoxy photopolymerization under visible LED light irradiation. *Polymer Chemistry* 8, 1579–1588.

111. Loiseau A, Asila V, Boitel-Aullen G, Lam M, Salmain M, Boujday S. 2019. Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors (Basel)*. 9(2):
112. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(38):14265–70
113. Lytle DA, Rice EW, Johnson CH, Fox KR. 1999. Electrophoretic mobilities of *Escherichia coli* 0157:H7 and wild-type *Escherichiacolistrains*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3222–3225.
114. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. 2010. Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. *Anal. Chim. Acta.* 659(1–2):23–33
115. Mariam J, Sivakami S, Dongre PM. 2016. Albumin corona on nanoparticles - a strategic approach in drug delivery. *Drug Deliv.* 23(8):2668–76
116. Martin P, Leibovich SJ. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 15(11):599–607
117. Mazi TA, Sarode GV, Czlonkowska A, Litwin T, Kim K, et al. 2019. Dysregulated Choline, Methionine, and Aromatic Amino Acid Metabolism in Patients with Wilson Disease: Exploratory Metabolomic Profiling and Implications for Hepatic and Neurologic Phenotypes. *Int. J. Mol. Sci.* 20(23):
118. Mazurek S. 2007. Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Found. Symp. Proc.* (4):99–124
119. Ma Y, Hong J, Ding Y. 2020. Biological behavior regulation of gold nanoparticles via the protein corona. *Adv. Healthc. Mater.* 9(6):e1901448
120. Massad E, de Menezes RX, Silveira PSP, Ortega NRS. 2004. *Métodos Quantitativos em Medicina.*
121. Mevik BH, Wehrens R. 2007. The pls Package: Principal Component and Partial Least Squares Regression in R. *Journal of Statistical Software*, 18(2), 1–23.

122. Mörters, Peter, Peres, Yuval. 2008. Brownian Motion.
123. Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. 2018. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*, 10 , 12871 —12934
124. Mehta KY, Wu H-J, Menon SS, Fallah Y, Zhong X, et al. 2017. Metabolomic biomarkers of pancreatic cancer: a meta-analysis study. *Oncotarget*. 8(40):68899–915
125. Mendes LF, Gaspar VM, Conde TA, Mano JF, Duarte IF. 2019. Flavonoid-mediated immunomodulation of human macrophages involves key metabolites and metabolic pathways. *Sci. Rep.* 9(1):14906
126. Mingyuan X, Qianqian P, Shengquan X, Chenyi Y, Rui L, et al. 2018. Hypoxia-inducible factor-1 α activates transforming growth factor- β 1/Smad signaling and increases collagen deposition in dermal fibroblasts. *Oncotarget*. 9(3):3188–97
127. Misra S, Oliver NS. 2015. Utility of ketone measurement in the prevention, diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. *Diabet. Med.* 32(1):14–23
128. Moman RN, Gupta N, Varacallo M. 2022. Physiology, Albumin. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
129. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65(1–2):55–63
130. Moulin V, Plamondon M. 2002. Differential expression of collagen integrin receptor on fetal vs. adult skin fibroblasts: implication in wound contraction during healing. *Br. J. Dermatol.* 147(5):886–92
131. Naganthran A, Verasoundarapandian G, Khalid FE, Masarudin MJ, Zulkharnain A, et al. 2022. Synthesis, characterization and biomedical application of silver nanoparticles. *Materials (Basel)*. 15(2):
132. Nagato H, Umebayashi Y, Wako M, Tabata Y, Manabe M. 2006. Collagen-poly glycolic acid hybrid matrix with basic fibroblast growth factor accelerated angiogenesis and granulation tissue formation in diabetic mice. *J. Dermatol.* 33(10):670–75

133. Narasimha VR, Latha TS, Pallu R, Panati K, Narala VR. 2021. Anticancer activities of biogenic silver nanoparticles targeting apoptosis and inflammatory pathways in colon cancer cells. *J. Clust. Sci.*, 1–17.
134. Neagu M, Piperigkou Z, Karamanou K, Engin AB, Docea AO, et al. 2017. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Arch. Toxicol.* 91(3):1031–48
135. Nelson DL, Cox M.M. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition.
136. Nguyen DD, Lue SJ, Lai J-Y. 2021. Tailoring therapeutic properties of silver nanoparticles for effective bacterial keratitis treatment. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 205:111856
137. Nguyen VP, Le Trung H, Nguyen, T.H.; Hoang, D.; Tran, T.H. 2021. Synthesis of biogenic silver nanoparticles with eco-friendly processes using *Ganoderma lucidum* extract and evaluation of their theranostic applications. *J. Nanomater.* 2021, 6135920.
138. Nonnenmacher Y, Hiller K. 2018. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cell. Mol. Life Sci.* 75(12):2093–2109
139. Novak ML, Koh TJ. 2013. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc. Biol.* 93(6):875–81
140. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, et al. 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood.* 112(6):2489–99
141. Oliveira CLPD, Pedersen J. S. 2009. Program package for data treatment, analysis and modeling.
142. Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG. 2014. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst.* 139(19):4855–61
143. Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, et al. 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 32(36):9810–17

144. Pearson RM, Juettner VV, Hong S. 2014. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Front. Chem.* 2:108
145. Pecora R. 2000. Dynamic Light Scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2:123-131.
146. Pecora R. 1964. Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions. *Chem. Phys.*, 40, 1604.
147. Pearson K. 1905. The Problem of the Random Walk. *Nature*. 72, 294.
148. Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, Li YR, Dedhia PH, et al. 2017. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*. 355(6326):748–52
149. Pratsinis A, Hervella P, Leroux J-C, Pratsinis SE, Sotiriou GA. 2013. Toxicity of silver nanoparticles in macrophages. *Small*. 9(15):2576–84
150. Rajendran S, Prakash V. 1993. Structural stability of beta-globulin, the low molecular weight protein fraction from sesame seed (*Sesamum indicum* L.) in alkaline solution. *Indian J. Biochem. Biophys.* 30(1):15–20
151. Ratriyanto A, Mosenthin R. 2018. Osmoregulatory function of betaine in alleviating heat stress in poultry. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 102(6):1634–50
152. Ribeiro de Azevêdo E. 2001. *Novas metodologias de Ressonância Magnética Nuclear para o Estudo da Dinâmica lenta em materiais orgânicos no Estado Sólido: Aplicações em Proteínas (Tese de Doutorado) Universidade de São Carlos: São Carlos.*
153. Roque A. 2016. *Apuntes-Aula 2. Biofísica II – FFCLRP – USP.* 5910187.
154. Sasidharan A, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. 2015. Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: impact and implications in biocorona formation. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 3(10):2075–82
155. Savolainen O, Fagerberg B, Vendelbo Lind M, Sandberg A-S, Ross AB, Bergström G. 2017. Biomarkers for predicting type 2 diabetes development-Can metabolomics improve on existing biomarkers? *PLoS ONE*. 12(7):e0177738

156. Sakurai JJ, Napolitano J. 2011. *Modern Quantum Mechanics*. ISBN.
157. Slichter CP. 1990. *Principles of Magnetic Resonance*; 3rd ed.; Springer-Verlag: Heidelberg (Germany), Vol.1.
158. Shimko A, Povolutckaia A, Mikhaylova A. 2014. Center for optical and laser materials research. Supported by OITSPSU. Saint Petersburg State University.
159. Singh A K. 2015. *Engineered nanoparticles: Structure, properties and mechanisms of toxicity*. Academic Press: New York.
160. Smith LM, Sanders Jz, kaizer RJ, Hughes P, Dodd C. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:667-679.
161. Stolnik S, Illum L, Davis S S. 1995. Long circulating microparticulate drug carriers *Adv. Drug Delivery Rev*, 16, 195– 214
162. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. 2006. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1762(2):164–80
163. Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. 2012. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation.* 126(9):1110–20
164. Shaker SA, Ayuob NN, Hajrah NH. 2011. Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by immunohistochemical study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 19(2):153–59
165. Shi W, Huang Y, Yang Z, Zhu L, Yu B. 2021. Reduction of TMAO level enhances the stability of carotid atherosclerotic plaque through promoting macrophage M2 polarization and efferocytosis. *Biosci. Rep.* 41(6):
166. Sinclair I, Bachman M, Addison D, Rohman M, Murray DC, et al. 2019. Acoustic Mist Ionization Platform for Direct and Contactless Ultrahigh-Throughput Mass Spectrometry Analysis of Liquid Samples. *Anal. Chem.* 91(6):3790–94
167. Su W-H, Cheng M-H, Lee W-L, Tsou T-S, Chang W-H, et al. 2010. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediators Inflamm.* 2010:413238

168. Tak YK, Pal S, Naoghare PK, Rangasamy S, Song JM. 2015. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci. Rep.* 5:16908
169. Thiessen S, Serra P, Amrani A, Verdaguer J, Santamaria P. 2002. T-cell tolerance by dendritic cells and macrophages as a mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmune diabetes. *Diabetes.* 51(2):325–38
170. Takara MPD. 2006. Propiedades Ópticas de Absorção e Emissão Fluorescente de Ácido orto-Aminobenzóico e seus Derivados em meio solvente(Tese de doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
171. Tolani P, Gupta S, Yadav K, Aggarwal S, Yadav AK. 2021. Big data, integrative omics and network biology. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 127:127–60
172. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(5):349–63
173. Triba MN, Starzec A, Bouchemal N, Guenin E, Perret GY, Le Moyec L. 2010. Metabolomic profiling with NMR discriminates between biphosphonate and doxorubicin effects on B16 melanoma cells. *NMR Biomed.* 23(9):1009–16
174. Tsai H-W, Wang P-H, Tsui K-H. 2018. Mesenchymal stem cell in wound healing and regeneration. *J. Chin. Med. Assoc.* 81(3):223–24
175. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier JA. 1951. study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55.
176. Ueland PM, Holm PI, Hustad S. 2005. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43(10):1069–75
177. van den Broek LJ, van der Veer WM, de Jong EH, Gibbs S, Niessen FB. 2015. Suppressed inflammatory gene expression during human hypertrophic scar compared to normotrophic scar formation. *Exp. Dermatol.* 24(8):623–29
178. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. 2017. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1859(9 Pt B):1558–72

179. van der Veer WM, Bloemen MCT, Ulrich MMW, Molema G, van Zuijlen PP, et al. 2009. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns*. 35(1):15–29
180. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 79(2):285–93
181. Vequi-Suplicy CC, Coutinho K, Teresa Lamy M. 2015. New Insights on the Fluorescent Emission Spectra of Prodan and Laurdan. Springer Science New York.
182. Vivas PCV. 2018. Caracterização estrutural de dispersões aquosas de vesículas lipídicas catiônicas com oligonucleotídeos (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
183. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, et al. 2014. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 219(9):695–703
184. Wang J, Wang L, Xu L, Shi Y, Liu F, et al. 2017a. Targeting Src attenuates peritoneal fibrosis and inhibits the epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*. 8(48):83872–89
185. Wang P-H, Huang B-S, Horng H-C, Yeh C-C, Chen Y-J. 2018. Wound healing. *J. Chin. Med. Assoc.* 81(2):94–101
186. Wang S, Meng X-M, Ng Y-Y, Ma FY, Zhou S, et al. 2016. TGF- β /Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis. *Oncotarget*. 7(8):8809–22
187. Wang X-Q, Song F, Liu Y-K. 2017b. Hypertrophic scar regression is linked to the occurrence of endothelial dysfunction. *PLoS ONE*. 12(5):e0176681
188. Wang X, Xia Y, Liu L, Liu M, Gu N, et al. 2010. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 95(2):357–64

189. Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ, Leslie AGW, Walker JE. 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(39):16823–27
190. Waghmare M, Khade B, Chaudhari P. et al. 2018. Multiple layer formation of bovine serum albumin on silver nanoparticles revealed by dynamic light scattering and spectroscopic techniques. *J Nanopart Res* 20, 185.
191. Ware BR, Flygare WH. 1971. The simultaneous measurement of the electrophoretic mobility and diffusion coefficient in bovine serum albumin solutions by light scattering. *Chem. Phys. Lett.* 12, 81–85.
192. Wilson WW, Wade MM, Holman SC, Champlin FR. 2000. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods* 43, 153–164.
193. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, et al. 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46(D1):D608–17
194. Wongkittichote P, Ah Mew N, Chapman KA. 2017. Propionyl-CoA carboxylase - A review. *Mol. Genet. Metab.* 122(4):145–52
195. Worley B, Powers R. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr. Metabolomics.* 1(1):92–107
196. Xia J, Wishart DS. 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 55:14.10.1-14.10.91
197. Xiangrong Li, Xuezhen W, Hongyi L, Yunhui Y, Tianjun N. 2021. Mechanism evaluation of the interactions between eight flavonoids and γ -globulin based on multi-spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1225, 129291, ISSN 0022-2860.
198. Xu L, Wang Y-Y, Huang J, Chen C-Y, Wang Z-X, Xie H. 2020a. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics.* 10(20):8996–9031
199. Xu X, Gu S, Huang X, Ren J, Gu Y, et al. 2020b. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids. *Burns Trauma.* 8:tkaa006

200. Yang T, Yao Q, Cao F, Liu Q, Liu B, Wang X-H. 2016. Silver nanoparticles inhibit the function of hypoxia-inducible factor-1 and target genes: insight into the cytotoxicity and antiangiogenesis. *Int. J. Nanomedicine*. 11:6679–92
201. Yan Y, Gause KT, Kamphuis MMJ, Ang C-S, O'Brien-Simpson NM, et al. 2013. Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. *ACS Nano*. 7(12):10960–70
202. You C, Li Q, Wang X, Wu P, Ho JK, et al. 2017. Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Sci. Rep.* 7(1):10489
203. Yuan F-L, Sun Z-L, Feng Y, Liu S-Y, Du Y, et al. 2019. Epithelial-mesenchymal transition in the formation of hypertrophic scars and keloids. *J. Cell. Physiol.* 234(12):21662–69
204. Zanette C, Pelin M, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, et al. 2011. Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicol In Vitro*. 25(5):1053–60
205. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17(9):
206. Zheng W, Lin G, Wang Z. 2021. Bioinformatics study on different gene expression profiles of fibroblasts and vascular endothelial cells in keloids. *Medicine (Baltimore)*. 100(47):e27777

ANEXO-1: PROTOCOLO DE DESCONGELAMENTO CELULAR

- Aquecer o meio (DMEM + 10% SFB), PBS e a tripsina no banho a 37°C;
 - Ligar o UV do fluxo laminar durante 20 min;
 - Limpar todo o fluxo laminar com gaze estéril e álcool 70%;
- Colocar a ponteira de vidro no sugador de material biológico e abrir a válvula de aspiração;
 - Separar um tubo falcon de 15 ml estéril e adicionar 8 ml;
- Retirar o *vial* do nitrogênio líquido (ver a localização das células no mapa das amostras crio-preservadas);
 - Levar o *vial* para o fluxo e descongelar as células na mão;
- Adicionar 1 ml de meio no *vial* quando as células estiverem descongelando;
- Inverter e verter o *vial* até as células estarem completamente descongeladas, verter o conteúdo do *vial* no falcon de 15 ml previamente separado;
 - Re-suspender o *pool* de células + meio (movimentos *up/down*);
 - Levar o tubo falcon 15 ml para a centrífuga por 3 min a 1300 rpm;
 - Voltar com o tubo falcon 15 ml cuidadosamente para o fluxo laminar;
 - Com o auxílio do sugador de material biológico, aspirar o sobrenadante cuidadosamente para não desmanchar o *pellet*;
 - Adicionar 2 ml de meio no tubo falcon 15 ml;
- Com o auxílio de uma pipeta graduada, re-suspender o *pellet* e homogeneizar o *pool* de células + meio (movimentos *up/down*);
- Retirar 200 μ l do *pool* de células + meio para fazer a contagem celular em câmara de Neubauer;
- Após a contagem, adicionar meio no tubo falcon 15 ml até completar 5 ml e transferir o *pool* de células + meio para uma garrafa de cultura T25 e colocar na incubadora a 37°C.

ANEXO-2 e 3: PROTOCOLO DE SUB-CULTIVO CELULAR

Limpeza do fluxo laminar:

- Ligar o UV do fluxo laminar durante 20 min;
- Limpar todo o fluxo laminar com gaze estéril e álcool 70%;
- Colocar a ponteira de vidro no sugador de material biológico e abrir a válvula de aspiração;

Separar os materiais de trabalho:

- Aquecer o meio (DMEM + 10% SFB), PBS e a tripsina no banho a 37°C;

Separar os materiais a serem utilizados no fluxo:

- (i) Tubo falcon de 15 ml;
- (ii) Garrafa de cultura T25;
- (iii) Pipetas descartáveis de 5 ml;
- (iv) Ponteiros descartáveis de 1000 μ l e 200 μ l;
- (v) Microtubo de 2 ml.
- Retirar a garrafa de cultura T25 da incubadora e levar para o fluxo laminar;
 - Aspirar o meio da garrafa de cultura T25;
 - Acrescentar 5 ml de PBS para lavar a garrafa;
 - Com o auxílio do sugador de material biológico, aspirar o PBS;
- Adicionar 1 ml de Tripsina na garrafa de cultura T25 e levar a garrafa para a incubadora a 37°C por aproximadamente 2 min;
- Observar no microscópio se as células se desprenderam do fundo da garrafa;
- Com o auxílio de uma pipeta, adicionar 4 ml de meio na garrafa e transferir o conteúdo para o tubo falcon 15 ml;
 - Re-suspender (movimentos *up/down*) o *pool* de células + meio;
 - Levar o tubo falcon 15 ml para a centrífuga por 3 min a 1300 rpm;
 - Voltar com o tubo falcon 15 ml cuidadosamente para o fluxo laminar;
 - Com o auxílio do sugador de material biológico, aspirar o sobrenadante cuidadosamente para não desmanchar o *pellet* de células formado pela centrifugação;
 - Adicionar 2 ml de meio no tubo falcon 15 ml;
- Com o auxílio de uma pipeta graduada, re-suspender o *pellet* e homogeneizar o *pool* de células + meio (movimentos *up/down*);

- Retirar 200 μl do *pool* de células + meio para fazer a contagem celular em câmara de Neubauer;
- Após a contagem, adicionar meio no tubo falcon 15 ml até completar 5 ml e transferir o *pool* de células + meio para uma garrafa de cultura T25 e colocar na incubadora a 37°C.

ANEXO-4: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO METABÓLICA PARA RMN

Extração metabólica das células e dos meio de cultura.

- Adicionar 2 mL de PBS para lavar as células
 - Aspirar todo o PBS
- Tripsinizar com 1 mL e levar a incubadora por 2 min
 - Observar que as células soltaram
- Adicionar 1 mL de PBS e, coletar as amostras em eppendorfes
- Centrifugar a 20°C e 1200 r.p.m durante 6 min e, em seguida, retirar com cuidado o meio
 - Repetir os dois passos anteriores de limpeza x3 vezes
- Adicionar as células do eppendorfes, 500 uL da solução (metanol:água) gelada na proporção (1:1)
- Iniciar o tratamento no ultrassom da solução célula extraída com o metanol, seguindo 60 s por 5 x seguidas com intervalos de 10 s
 - Centrifugar a solução de celulas a 4°C e 2100 r.p.m durante 90 min
- Coletar aproximadamente 70% do sobrenadante do eppendorf, em outro eppendorf e guardar no freezer da geladeira.
 - Liofilizar as amostras por 24 h

ANEXO-5: DMEM alta-glicose Composição:**SAIS INORGÂNICOS *mg/L*:**

1. Cloreto de cálcio $2H_2O$ 265,00
2. Nitrato férrico $9H_2O$ 0,10
3. Sulfato de magnésio (anidro) 97,72
4. Cloreto de potássio 400,00
5. Cloreto de sódio 6400,00
6. Fosfato de sódio (anidro) 109,00

AMINOÁCIDOS *mg/L*:

1. Glicina 30,00
2. Hidroclorato de L-Arginina 84,00
3. Dihidroclorato de L-Cistina 62,57
4. L-Glutamina 584,00
5. Hidroclorato de L-Histidina monohidratado 42,00
6. L-Isoleucina 105,00
7. L-Leucina 105,00
8. L-Leucina 105,00
9. Hidroclorato de L-Lisina 146,00
10. L-Metionina 30,00
11. L-Fenilalanina 66,00
12. L-Serina 42,00
13. L-Treonina 95,00

14. L-Triptofano 16,00
15. L-Tirosina (Sal dissódico) 103,79
16. L-Valina 94,00

VITAMINAS *mg/L*:

1. Cloreto de Colina 4,00
2. D-Ca-Pantotenato 4,00
3. Ácido Fólico 4,00
4. Nicotinamida 4,00
5. Hidroclorato de Piridoxina 4,00
6. Riboflavina 0,40
7. Hidroclorato de Tiamina 4,00
8. i-Inositol 7,20

OUTROS mg/L :

9. D-Glicose 4500,00
 10. Vermelho Fenol (Sal Sódico) 15,90
- Piruvato de sódio 110,00

FIGURA SUPLEMENTAR 1

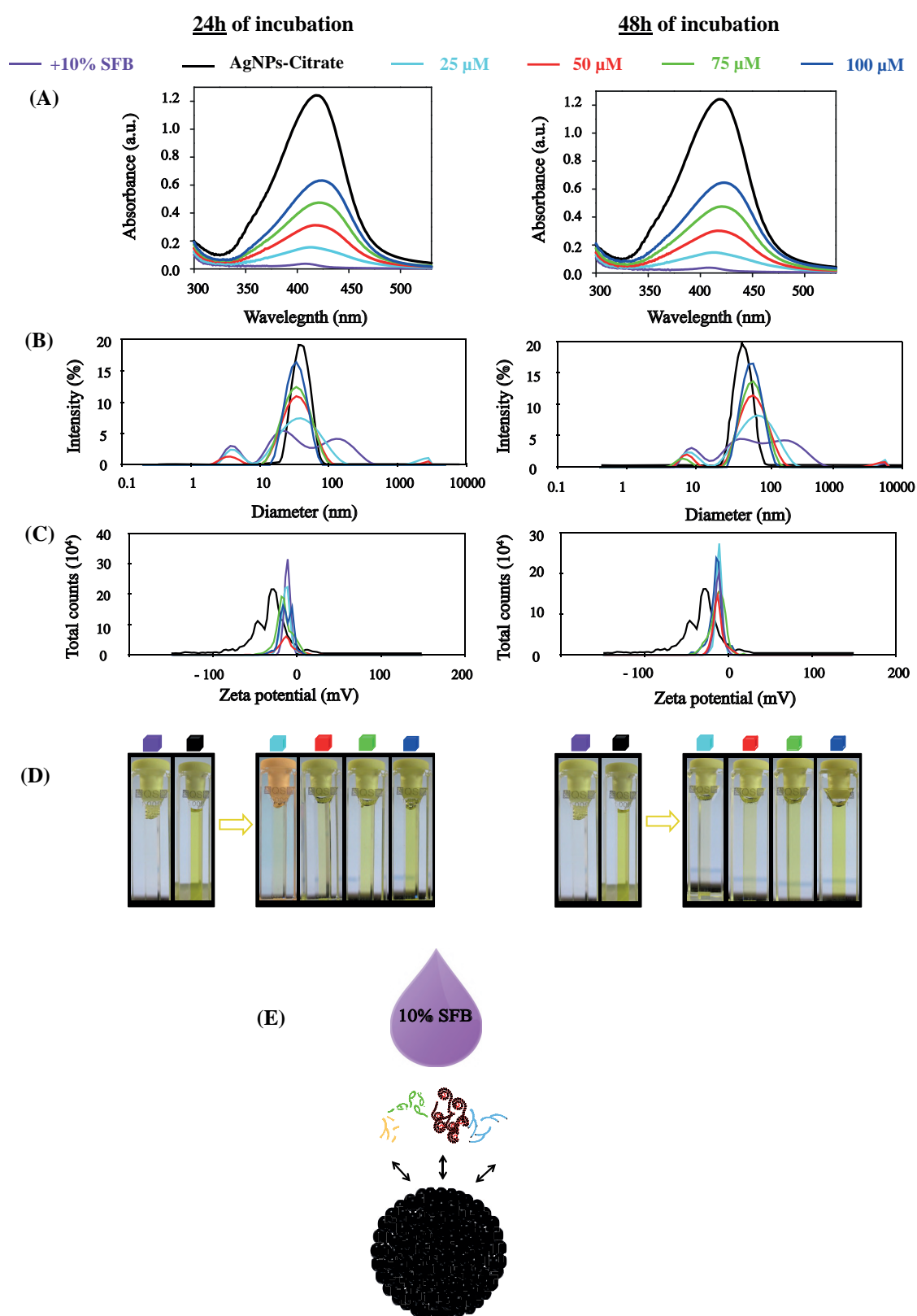


Figura 45: Resultados de absorção UV-vis (A), DLS (B), potencial zeta (B) e imagens de turbidez (C) para AgNPs-Citrate diluído em 10% SFB em água ultra pura para a obtenção das concentrações molar 25, 50, 75 e 100 μ M de AgNPs, após 24 e 48 horas de incubação.

FIGURA SUPLEMENTAR 2

(A)

Metabolite	After 24 hours				Metabolite	After 48 hours			
	0 uM	50 uM	75uM	100 uM		0 uM	25 uM	50uM	100 uM
<u>UDP-GlcNAc</u>	100.0 A	110.3 ↑ B +10%	46.5 ↓ C -54%	24.2 ↓ D -76%	<u>UDP-GlcNAc</u>	100.0 A	77.6 ↓ B -22%	65.1 ↓ C -35%	42.4 ↓ D -57%
<u>α-GLC</u>	100.0 A	180.5 ↑ B +80%	419.8 ↑ C +320%	579.1 ↑ D +479%	Ala	100.0 A	75.2 ↓ B -25%	73.7 ↓ B -26%	33.4 ↓ C -67%
<u>Glutamate</u>	100.0 A	102.7 ↑ A +3%	59.9 ↓ B -40%	41.8 ↓ C -58%	Lac	100.0 A	74.6 ↓ B -24%	69.8 ↓ C -30%	58.2 ↓ D -42%
<u>Sn-Glycer-3-PC</u>	100.0 A	109.8 ↑ B +10%	64.3 ↓ C -36%	18.6 ↓ D -82%	<u>Sn-Glycer-3-PC</u>	100.0 A	65.4 ↓ B -35%	53.9 ↓ C -46%	38.5 ↓ D -61%
<u>O-Phosphocholine</u>	100.0 A	178.5 ↑ B +79%	49.0 ↓ C -51%	16.0 ↓ D -84%	<u>O-Phosphocholine</u>	100.0 A	72.5 ↓ B -27%	81.0 ↓ B -19%	39.2 ↓ C -60%
<u>N-Acetylcysteine*</u>	100.0 A	126.6 ↑ B +27%	78.6 ↓ C -22%	44.5 ↓ D -55%	<u>N-Acetylcysteine</u>	100.0 A	78.5 ↓ B -21%	73.4 ↓ B -26%	52.4 ↓ C -47%
<u>Leu</u>	100.0 A	114.5 ↑ A +14%	212.1 ↑ B +112%	238.9 ↑ C +139%	<u>Leu</u>	100.0 A	84.5 ↓ B -15%	80.9 ↓ C -20%	73.0 ↓ D -27%
<u>FA</u>	100.0 A	71.7 ↓ B -28%	61.5 ↓ C -38%	64.3 ↓ D -41%	Ileu	100.0 A	69.4 ↓ B -31%	63.2 ↓ C -37%	58.4 ↓ D -42%
<u>Cr</u>	100.0 A	125.7 ↑ B +26%	29.7 ↓ C -70%	14.4 ↓ D -86%	<u>Cr</u>	100.0 A	72.6 ↓ B -27%	60.0 ↓ C -40%	11.3 ↓ D -89%
<u>2-Oxoisocaproate</u>	100.0 A	106.4 ↑ A +6%	170.3 ↑ B +70%	171.8 ↑ B +72%	Glycine	100.0 A	75.6 ↓ B -24%	67.3 ↓ C -33%	49.4 ↓ D -51%
<u>ADP*</u>	100.0 A	80.1 ↓ B -20%	64.8 ↓ C -35%	62.6 ↓ C -32%	<u>ADP*</u>	100.0 A	90.3 ↓ B -10%	75.8 ↓ C -24%	73.6 ↓ C -26%
					AMP	100.0 A	62.2 ↓ B -38%	53.4 ↓ C -47%	48.8 ↓ D -52%

(B)

Metabolite	After 24 hours				Metabolite	After 48 hours			
	0 uM	50 uM	75uM	100 uM		0 uM	25 uM	50uM	100 uM
<u>α-GLC</u>	100.0 A	94.0 ↓ A -6%	87.9 ↓ B -12%	78.5 ↓ C -22%	<u>α-GLC</u>	100.0 A	82.1 ↓ B -18%	83.7 ↓ B -16%	76.1 ↓ C -24%
<u>Lac</u>	100.0 A	72.0 ↓ B -28%	47.3 ↓ C -57%	27.8 ↓ D -71%	Lac	100.0 A	53.8 ↓ B -46%	34.9 ↓ C -65%	14.5 ↓ D -85%
<u>Leu*</u>	100.0 A	110.3 ↑ B +10%	108.5 ↑ B +9%	119.6 ↑ C +20%	<u>Leu</u>	100.0 A	106.1 ↑ A +6%	110.2 ↑ B +10%	131.1 ↑ C +31%
<u>Pyroglutamate*</u>	100.0 A	104.3 ↑ A +4%	90.2 ↓ B -10%	88.3 ↓ B -12%	<u>Met</u>	100.0 A	104.2 ↑ B +4%	108.2 ↑ BC +8%	128.0 ↑ C +28%
<u>AcDH</u>	100.0 A	112.3 ↑ B +12%	146.4 ↑ C +46%	197.6 ↑ D +98%	<u>AcDH*</u>	100.0 A	160.0 ↑ B +60%	202.7 ↑ C +103%	270.4 ↑ D +170%
<u>Ala*</u>	100.0 A	108.8 ↑ B +9%	87.5 ↓ C -8%	79.0 ↓ D -21%	Ileu	100.0 A	106.1 ↑ A +6%	110.0 ↑ B +10%	134.7 ↑ C +35%
<u>FA</u>	100.0 A	78.7 ↓ B -21%	66.0 ↓ B -34%	54.6 ↓ C -45%	<u>FA</u>	100.0 A	69.6 ↓ B -30%	54.5 ↓ C -45%	59.4 ↓ C -41%
<u>Propyleneglicol*</u>	100.0 A	89.3 ↓ B -11%	85.6 ↓ B -14%	77.5 ↓ C -24%	<u>Propyleneglicol</u>	100.0 A	80.0 ↓ B -20%	72.0 ↓ C -28%	42.8 ↓ D -58%
<u>Succinate*</u>	100.0 A	109.5 ↑ B +10%	113.8 ↑ B +14%	118.0 ↑ C +18%	<u>Phe*</u>	100.0 A	102.4 ↑ A +2%	115.0 ↑ C +15%	126.0 ↑ D +26%
<u>Acetone</u>	100.0 A	142.5 ↑ B +43%	242.0 ↑ C 142%	339.0 ↑ D +239%	<u>Acetone</u>	100.0 A	113.2 ↑ B +13%	137.5 ↑ C +37%	193.4 ↑ D +93%
					3-Methyl-2-oxovale*	100.0 A	87.2 ↓ B -13%	86.3 ↓ B -14%	68.1 ↓ C -32%
					Choline	100.0 A	77.8 ↓ B -22%	46.3 ↓ C -54%	49.7 ↓ C -50%

Figura 46: Comparação dos valores normalizados de cada metabolito dos extratos celulares (A) e meio de cultura (B) para a célula FN1 tratada com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 h. As diferentes letras inseridas abaixo dos valores normalizados indicam as diferenças estatísticas entre eles, testados por Fisher's test (95% confiança, $p < 0.01$).

FIGURA SUPLEMENTAR 3

(A)	After 24 hours					After 48 hours				
	Metabolite	0 uM	50 uM	75uM	100 uM	Metabolite	0 uM	25 uM	50uM	100 uM
	<u>UDP-GlcNAc</u>	100.0	89.6 ↓ A B	72.0 ↓ C -28%	31.3 ↓ D -69%	<u>UDP-GlcNAc</u>	100.0	77.0 ↓ A B	39.0 ↓ C -61%	14.5 ↓ D -85%
	<u>O-Phosphocholine</u>	100.0	43.3 ↓ A B	30.4 ↓ C -70%	11.1 ↓ D -91%	<u>NADP+</u>	100.0	103.0 ↑ A A	85.4 ↓ B -15%	62.8 ↓ C -37%
	<u>NADP+</u>	100.0	75.0 ↓ A B	74.4 ↓ B -26%	66.8 ↓ C -31%	<u>AcDH*</u>	100.0	115.7 ↑ A B	125.1 ↑ C +25%	162.5 ↑ D +63%
	<u>Lac*</u>	100.0	83.7 ↓ A B	65.0 ↓ C -35%	70.5 ↓ C -29%	<u>Sn-Glycer-3-PC</u>	100.0	84.7 ↓ A B	54.9 ↓ C -45%	30.3 ↓ D -70%
	<u>AcDH</u>	100.0	133.2 ↑ A B	162.6 ↑ C +63%	265.6 ↑ D +166%	<u>N-Acetylcysteine</u>	100.0	70.7 ↓ A B	39.3 ↓ C -61%	11.0 ↓ D -91%
	<u>Sn-Glycer-3-PC</u>	100.0	76.0 ↓ A B	73.0 ↓ B -28%	32.7 ↓ C -67%	<u>Cr</u>	100.0	76.2 ↓ A B	53.5 ↓ C -46%	23.3 ↓ D -77%
	<u>N-Acetylcysteine</u>	100.0	98.7 ↓ A A	70.0 ↓ B -30%	33.1 ↓ C -67%	<u>Valerate</u>	100.0	104.0 ↑ A A	114.2 ↑ B +14%	118.8 ↑ B +18%
	<u>Cr</u>	100.0	47.0 ↓ A B	27.0 ↓ C -73%	9.3 ↓ D -91%	<u>Leu</u>	100.0	98.0 ↓ A A	87.5 ↓ B -12%	86.0 ↓ B -14%
	<u>Valerate</u>	100.0	103.0 ↑ A A	158.3 ↑ B +58%	174.7 ↑ C +75%	<u>Ileu</u>	100.0	98.8 ↓ A A	79.0 ↓ B -21%	67.0 ↓ C -33%
	<u>Leu</u>	100.0	106.7 ↑ A A	116.8 ↑ B +17%	120.2 ↑ B +20%	<u>Ala</u>	100.0	91.8 ↓ A B	58.5 ↓ C -41%	46.4 ↓ D -54%
	<u>AMP</u>	100.0	99.6 ↓ A A	66.4 ↓ B -34%	52.7 ↓ C -48%	<u>Glycine</u>	100.0	92.0 ↓ A B	92.1 ↓ B -8%	71.8 ↓ C -28%
	<u>Ala</u>	100.0	68.1 ↓ A B	36.4 ↓ C -64%	38.5 ↓ C -62%					
	<u>Glycine</u>	100.0	79.4 ↓ A B	57.3 ↓ C -43%	42.8 ↓ D -57%					

(B)	After 24 hours					After 48 hours				
	Metabolite	0 uM	50 uM	75uM	100 uM	Metabolite	0 uM	25 uM	50uM	100 uM
	<u>α-GLC</u>	100.0	95.4 ↓ A B	89.7 ↓ C -10%	71.4 ↓ D -29%	<u>α-GLC</u>	100.0	91.6 ↓ A B	76.4 ↓ C -24%	55.0 ↓ D -45%
	<u>β-GLC</u>	100.0	80.0 ↓ A B	56.4 ↓ C -44%	35.4 ↓ D -65%	<u>β-GLC*</u>	100.0	70.2 ↓ A B	49.3 ↓ C -51%	43.0 ↓ C -57%
	<u>Lac</u>	100.0	65.8 ↓ A B	44.0 ↓ B -56%	26.2 ↓ C -74%	<u>Lac</u>	100.0	70.8 ↓ A B	69.8 ↓ B -31%	39.4 ↓ C -61%
	<u>Pyroglutamate</u>	100.0	88.5 ↓ A B	80.9 ↓ C -20%	59.1 ↓ D -41%	<u>Pyroglutamate*</u>	100.0	80.7 ↓ A B	61.2 ↓ C -39%	54.4 ↓ C -46%
	<u>Leu</u>	100.0	131.5 ↑ A B	157.4 ↑ C +57%	181.6 ↑ D +82%	<u>Leu</u>	100.0	105.0 ↑ A A	135.4 ↑ B +35%	136.0 ↑ B +36%
	<u>Cad</u>	100.0	97.6 ↓ A A	66.5 ↓ B -33%	72.5 ↓ B -28%	<u>Cad</u>	100.0	95.0 ↓ A A	80.7 ↓ B -20%	66.5 ↓ C -33%
	<u>AcDH</u>	100.0	218.8 ↑ A B	262.0 ↑ C +162%	261.0 ↑ C +161%	<u>AcDH</u>	100.0	177.0 ↑ A B	204.0 ↑ C +104%	234.3 ↑ D +134%
	<u>FA*</u>	100.0	77.6 ↓ A B	58.6 ↓ C -41%	36.5 ↓ D -64%	<u>FA</u>	100.0	93.0 ↓ A A	59.2 ↓ B -41%	42.2 ↓ B -58%
	<u>Ala</u>	100.0	87.3 ↓ A B	81.7 ↓ C -18%	60.6 ↓ D -40%	<u>Ileu*</u>	100.0	125.3 ↑ A B	146.7 ↑ C +46%	147.2 ↑ C +47%
	<u>N-Acetylglutamate</u>	100.0	139.6 ↑ A B	139.1 ↑ B +39%	158.1 ↑ C +58%	<u>N-Acetylglutamate*</u>	100.0	110.6 ↑ A A	130.6 ↑ B +31%	129.7 ↑ B +30%
	<u>Propylene glycol</u>	100.0	80.3 ↓ A B	55.0 ↓ C -45%	40.5 ↓ D -60%	<u>Propylene glycol</u>	100.0	90.7 ↓ A B	29.0 ↓ C -71%	34.0 ↓ C -66%
	<u>N-Acetylaspartate*</u>	100.0	115.4 ↑ A B	111.5 ↑ B +11%	129.2 ↑ C +29%	<u>N-Acetylaspartate</u>	100.0	111.7 ↑ A B	165.4 ↑ C +65%	169.2 ↑ C +69%
	<u>Acetone</u>	100.0	127.0 ↑ A A	266.0 ↑ B +166%	273.1 ↑ C +173%	<u>Acetone</u>	100.0	104.8 ↑ A A	149.1 ↑ B +49%	178.5 ↑ C +79%

Figura 47: Comparação dos valores normalizados de cada metabolito dos extratos celulares (A) e meio de cultura (B) para a célula HUV-EC-C tratada com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 h. As diferentes letras inseridas abaixo dos valores normalizados indicam as diferenças estatísticas entre eles, testados por Fisher's test (95% confiança, $p < 0.01$).

FIGURA SUPLEMENTAR 4

(A)	After 24 hours					After 48 hours				
	Metabolite	0 uM	50 uM	75uM	100 uM	Metabolite	0 uM	25 uM	50uM	100 uM
	Creatine	100.0	48.5 ↓ B	41.0 ↓ B	38.1 ↓ B	Creatine	100.0	90.4 ↓ B	49.1 ↓ B	7.9 ↓ C
			-52%	-59%	-62%			-10%	-51%	-93%
	O-Phosphocholine	100.0	48.3 ↓ B	50.4 ↓ BC	35.8 ↓ C	O-Phosphocholine	100.0	104.5 ↓ A	50.0 ↓ B	6.5 ↓ C
			-52%	-50%	-64%			-46%	-65%	-85%
	Trimethylam N-oxide	100.0	59.6 ↓ B	46.8 ↓ C	46.9 ↓ C	Trimethylam N-oxide	100.0	23.4 ↓ B	10.0 ↓ C	5.6 ↓ C
			-43%	-53%	-53%			-77%	-90%	-95%
	Alanine	100.0	66.1 ↓ B	70.1 ↓ B	49.5 ↓ C	Alanine	100.0	48.5 ↓ B	37.0 ↓ B	27.7 ↓ C
			-34%	-30%	-50%			52%	-63%	-72%
	Lactate	100.0	75.9 ↓ B	71.8 ↓ B	69.7 ↓ B	Lactate*	100.0	67.7 ↓ B	48.3 ↓ C	20.1 ↓ D
			-24%	-28%	-30%			-32%	-52%	-80%
	Sn-Glycer-3-PC	100.0	87.7 ↓ B	60.4 ↓ C	58.2 ↓ C	Sn-Glycer-3-PC	100.0	31.4 ↓ B	31.8 ↓ B	10.1 ↓ C
			-12%	-40%	-42%			-69%	-68%	-90%
	Glycine*	100.0	85.6 ↓ A	69.1 ↓ B	61.8 ↓ B	Glycine	100.0	53.3 ↓ B	29.9 ↓ C	6.4 ↓ D
			-14%	-31%	-38%			-47%	-70%	-94%
	Betaine	100.0	80.0 ↓ B	70.8 ↓ C	40.2 ↓ D	Betaine	100.0	60.0 ↓ B	50.8 ↓ C	16.2 ↓ D
			-20%	-31%	-60%			-40%	-49%	-84%

(B)	After 24 hours					After 48 hours				
	Metabolite	0 uM	50 uM	75uM	100 uM	Metabolite	0 uM	25 uM	50uM	100 uM
	Lactate *	100.0	175.8 ↑ B	145.5 ↑ AB	66.2 ↓ C	Lactate	100.0	90.5 ↓ A	97.9 ↓ A	41.6 ↓ B
			+75%	+45%	-34%			-9%	-2%	-57%
	Citrate	100.0	247.0 ↑ B	349.0 ↑ C	435.2 ↑ D	Citrate	100.0	188.9 ↑ B	279.4 ↑ C	857.4 ↑ D
			+147%	+249%	+335%			+89%	+179%	+757%
	Leucine	100.0	90.2 ↓ A	91.6 ↓ A	113.8 ↑ B	Leucine	100.0	122.3 ↑ A	115.9 ↑ A	179.7 ↑ B
			-10%	-9%	+14%			+22%	+15%	+80%
	Isoleucine *	100.0	96.0 ↓ A	95.1 ↓ A	113.5 ↑ B	Isoleucine *	100.0	136.7 ↑ A	121.8 ↑ A	177.8 ↑ B
			-4%	-5%	+14%			+37%	+22%	+78%
	Phenylalanine	100.0	101.9 ↑ A	103.1 ↑ A	112.0 ↑ B	Phenylalanine *	100.0	109.0 ↑ B	113.8 ↑ B	135.5 ↑ C
			+2%	+3%	+12%			+9%	+14%	+36%
	Choline*	100.0	106.9 ↑ A	108.3 ↑ A	134.7 ↑ B	Choline	100.0	110.0 ↑ B	118.5 ↑ B	152.0 ↑ C
			+7%	+8%	+35%			+10%	+19%	+52%
	Pyroglutamate *	100.0	108.0 ↑ B	102.8 ↓ AB	77.3 ↓ C	Pyroglutamate	100.0	90.1 ↓ B	83.8 ↓ B	50.3 ↓ C
			+8%	+2%	-23%			-10%	-16%	-50%
	Threonine *	100.0	110.9 ↑ B	119.3 ↑ C	143.5 ↑ C	Tryptophan	100.0	118.5 ↑ B	111.2 ↑ B	160.3 ↑ C
			+10%	+19%	+44%			+18%	+11%	+60%
	Valine	100.0	120.0 ↑ B	104.5 ↑ AB	152.0 ↑ C	Valine	100.0	120.0 ↑ B	104.5 ↑ AB	152.0 ↑ C
					+60%					+60%

Figura 48: Comparação dos valores normalizados de cada metabolito dos extratos celulares (A) e meio de cultura (B) para a célula RAW 264.7 tratada com diferentes concentrações de AgNPs por 24 e 48 h. As diferentes letras inseridas abaixo dos valores normalizados indicam as diferenças estatísticas entre eles, testados por Fisher's test (95% confiança, $p < 0.01$).

