

# INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

# Nanopartículas de ouro para terapia e diagnóstico de câncer utilizando nanotecnologia verde

# JORGE GABRIEL DOS SANTOS BATISTA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador: Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo 2020

# INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Nanopartículas de ouro para terapia e diagnóstico de câncer utilizando nanotecnologia verde

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

JORGE GABRIEL DOS SANTOS BATISTA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador: Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo 2020

#### Fonte de Financiamento: CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

DOS SANTOS BATISTA, J. G. . *Nanopartículas de ouro para terapia e diagnóstico de câncer utilizando nanotecnologia verde*. 2020. 127 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <a href="http://repositorio.ipen.br/">http://repositorio.ipen.br/</a>) (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

dos Santos Batista, Jorge Gabriel Nanopartículas de ouro para terapia e diagnóstico de câncer utilizando nanotecnologia verde / Jorge Gabriel dos Santos Batista; orientador Ademar Benévolo Lugão. -- São Paulo, 2020. 127 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020. 1. Nanotecnologia verde. 2. Terapia e diagnóstico de câncer. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Radiação ionizante. 5. Nanopartículas de Ouro/Albumina (núcleo/casca). I. Benévolo Lugão, Ademar, orient. II. Título.

# DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Ana Carolina e aos meus amados filhos Joffre e Isaac

Aos meus pais Margarida e Williams, sempre!

A Maurício, Glaucia, Janaina e Jaqueline meus queridos irmãos.

A Laiza, Elisa, Mariana, Amanda e Thomas, minhas queridas sobrinhas e sobrinho.

> Aos meus avós Joffre e Jardilina "In Memoriam"

Aos meus fiéis escudeiros Ayra, Jimmy e Mandraque e Chocolate

# AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Prof. Ademar Benévolo Lugão, pela oportunidade, orientação e compreensão.

À CAPES, pela bolsa cedida.

Ao IPEN, pela oportunidade e infraestrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CEQMA e colegas por todo apoio.

Ao Dr. José Roberto Rogero e à Dra. Sizue Ota Rogero, pelas contribuições e todo o apoio.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho "*In Memoriam*", pelas contribuições, ideias e por tudo que representou e continuará representando para a ciência no Brasil.

À Divisão de Ensino, pela atenção e paciência.

À equipe de microscopia eletrônica do ICB-USP.

Ao Dr. Pablo e ao técnico Paulo (CETER), pela disponibilidade e energia.

À Dra. Maria José, pelo exemplo de vida e pelas ideias.

Ao Dr. Fábio Marques pelas parcerias e colaborações.

À toda equipe Nanothera composta pelos Doutores Lucas F. Freitas, Aryel Heitor, Velaphi C. Thipe, Fabiane N. Riello, às Mestras Adriana Kuchinski e Caroline Lima, à Mestranda Camila e aos alunos de Iniciação Científica, Cássia, Lucas, Ana Paula e Adriana pela parceria, colaboração e convivência.

À equipe da Biblioteca do IPEN, pela disponibilidade e boa vontade.

À equipe do IQ-USP pela atenção, colaboração e disponibilidade.

À Ms. Ana Carolina Moreira Fonseca, pelas contribuições, apoio, carinho e paciência.

A todos os meus amigos, eles(as) sabem quem são, pela paciência e confiança durante está empreitada.

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação Microscopia eletrônica é reconhecida pela assistência durante os experimentos (ME-22684).

# **EPÍGRAFE**

Iê Maior é Deus, pequeno sou eu (Tudo) O que eu tenho foi Deus que me deu Mestre Pastinha

Se fosse fácil achar o caminho das pedras Tantas pedras no caminho não seria(m) ruim Humberto Gessinger

Nem todos que sonharam conseguiram, mas pra conseguir é preciso sonhar. Gabriel O Pensador

Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso. Albert Einstein

O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário. Stubby Currence

> Não sou dono do mundo, mas sou filho do dono.

#### RESUMO

DOS SANTOS BATISTA, J. G. *Nanopartículas de ouro para terapia e diagnóstico de câncer utilizando nanotecnologia verde*. 2020. 127 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) vem sendo amplamente estudadas por atenderem às necessidades de sistemas nanocarreadores na terapia e diagnóstico de câncer. Elas podem ser usadas no direcionamento e liberação de fármacos a sítios ou grupos celulares específicos, atuar como radiossensibilizadores e em terapias fototérmicas como agente gerador de calor. Um número significativo de estudos demonstrou suas possíveis aplicações, tais como biossensores, contraste na imagiologia biológica, em sistemas de liberação de fármacos, terapia e diagnóstico do câncer. Assim, as nanopartículas de ouro são consideradas promissoras no desenvolvimento de novos compostos com potencial aplicação na medicina oncológica, no tratamento de inflamações crônicas, infecções, doenças degenerativas e autoimunes. No entanto, apesar das formas nanométricas de ouro apresentarem menor toxicidade comparada aos muitos outros nanomateriais, a toxicidade dessas partículas deve ser minuciosamente avaliada. O maior desafio é propor um método para funcionalizar a superfície das nanopartículas, e assim modular sua farmacocinética e farmacodinâmica, além de atender aos requisitos de toxicidade para aprovação e aplicação de um nanobiomaterial. O objetivo desse estudo foi desenvolver um método de síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) com potencial aplicação como um nanobiomaterial na teranóstica (terapia e diagnóstico) do câncer. Para tanto, foi utilizado o conceito de nanotecnologia verde, em que compostos fitoquímicos com potencial redutor foram utilizados no preparo das AuNPs. Também foi estabelecido um método de funcionalização de AuNPs por recobrimento com albumina do soro bovino e humano utilizando radiação ionizante. A importância do recobrimento com albumina está relacionada a afinidade dessa proteína com os receptores glicoproteicos GP60, que são encontrados em diversas células tumorais, além de contribuir potencialmente com a cinética das

nanopartículas de ouro. A caracterização físico-química das AuNPs e a reprodutibilidade do método foi avaliada com base nos ensaios de caracterização técnicas de espectrofotometria UV-Vis/Fluorescência, realizados pelas espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial Zeta, microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e eletroforese em gel (SDS-PAGE). A estabilidade foi avaliada em relação à temperatura, pH, concentração de NaCl, PBS, solução contendo aminoácidos e meio de cultura celular DMEM sem e com suplementação de soro fetal bovino. As linhagens celulares utilizadas foram câncer de próstata humano (PC3), adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB 231) e células de tecido pulmonar de hamster chinês macho (V79-4). Nas concentrações testadas as AuNPs não apesentaram citotoxicidade in vitro utilizando o método do vermelho neutro e MTT. Para a avaliação preliminar da nanotoxicidade foi realizado o estudo in vivo utilizando o peixe zebra. Nos estudos de internalização in vitro das nanopartículas utilizando as linhagens tumorais MDA-MB 231 e PC3 foi possível verificar qualitativamente a internalização das AuNPs. Os ensaios de radiomarcação das EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASHy precisam ser otimizados quanto à estabilidade e pureza radioquímica. A nanotecnologia verde provou ser uma ferramenta valiosa na síntese de nanopartículas de ouro em relação à toxicidade, não exigindo etapas de eliminação de solventes e substâncias potencialmente tóxicas.

#### ABSTRACT

DOS SANTOS BATISTA, J. G. **Gold nanoparticles for cancer therapy and diagnosis using green nanotechnology**. 2020. 127 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

Gold nanoparticles (AuNPs) have been studied to meet the needs of nanocarrier systems in cancer therapy and diagnosis. They can be used to target and release drugs at specific cell sites or groups, act as radiosensitizers, and in photothermal therapies as a heat-generating agent. A significant number of studies used its possible applications, such as biosensors, contrast in biological images, drug delivery systems, and cancer therapy and diagnosis. Thus, gold nanoparticles are considered as promising in the development of new compounds with potential application in cancer medicine, in the treatment of chronic inflammation, diseases, degenerative and autoimmune diseases. However, although the nanometric forms of gold are less toxic compared to many other nanomaterials, the toxicity of these particles must be thoroughly evaluated. The biggest challenge is to propose a method to functionalize the surface of the nanoparticles, and thus modulate their pharmacokinetics and pharmacodynamics, in addition to meeting the toxicity requirements for approval and application of nano biomaterials. The objective of this study was to develop a method of synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) with potential application as nano biomaterials in cancer therapy and diagnosis (theranostic). For this purpose, the concept of green nanotechnology was used, in which phytochemical compounds with reducing potential were used in the preparation of AuNPs. A method of AuNPs functionalization was also established through recovery with bovine and human serum albumin using ionizing radiation. The importance of albumin coating is equal to a protein of this protein with GP60 receptors, which are found in several tumor cells, in addition to contributing in several relational cells to the kinetics of gold nanoparticles. The physico-chemical

characterization of AuNPs and the reproducibility of the method was evaluated based on characterization tests performed by the techniques of UV-Vis / Fluorescence spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS), Zeta potential, transmission electron microscopy (MET), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and gel electrophoresis (SDS-PAGE). Stability was evaluated by means of temperature, pH, NaCl concentration, PBS, a solution containing amino acids, and DMEM cell culture medium without and with fetal bovine serum supplementation. The cell lines used were human prostate cancer (PC3), human breast adenocarcinoma (MDA-MB 231) and male Chinese hamster lung tissue cells (V79-4). In the recommendations tested as AuNPs, they did not show cytotoxicity in vitro using the neutral red method and MTT. For a preliminary assessment of nanotoxicity, an in vivo study using zebrafish was performed. In the in vitro internalization studies of the nanoparticles using the tumor lines MDA-MB 231 and PC3 it was possible to qualitatively verify the internalization of AuNPs. The radiolabeling assays for EGCG-AuNPs and EGCG-AuNPs-ASHy need to be optimized for radiochemical stability and purity. Green nanotechnology has proven to be a valuable tool in the synthesis of gold nanoparticles with lower toxicity, requiring no steps to eliminate solvents and potentially toxic substances.

# SUMÁRIO

		Página
1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Objetivo	21
1.2	Justificativa	21
2	ESTADO DA ARTE	23
2.1	História	23
2.2	Nanotecnologia	24
2.3	Nanopartículas de Ouro	27
2.4	Características eletrônicas das AuNPs	29
2.5	Métodos de sínteses de nanopartículas de ouro	32
2.5.1	Métodos de dispersão (top-down)	32
2.5.2	Métodos de condensação ( <i>bottom-up</i> )	32
2.6	Nanotecnologia verde - Green Nanotechnology	34
2.6.1	Catequinas e Polifenóis do Chá:	34
2.7	Nanomedicina e o Câncer	35
2.8	Nanopartículas de ouro radioativas ou radiomarcadas	36
2.9	Principais técnicas utilizadas em nanotecnologia	
	Caracterização físico-química de nanopartículas de ouro	40
2.9.1	Espectroscopia UV-Visível	40
2.9.2	Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH	42
2.9.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	43
2.9.4	Potencial Zeta	44
2.9.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
2.9.6	Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma	
	Acoplado Indutivamente (ICP-OES)	47

2.9.7	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS PAGE	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Planejamento experimental	50
3.2	Síntese das nanopartículas	51
3.3	Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro	53
3.3.1	Espectrofotometria UV-Visível	53
3.3.2	Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH	53
3.3.3	Rendimento da Síntese por Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)	54
3.3.4	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	54
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	55
3.3.6	Eletroforese: SDS-PAGE	56
3.4	Avaliação da Citotoxicidade	57
3.4.1	Citotoxicidade in vitro	57
3.4.2	Citotoxicidade <i>in vivo</i> : peixe zebra	58
3.5	Estudo <i>in vitro</i> da internalização Celular das EGCG-AuNPs:	
	CytoVIVA	62
3.6	Radiomarcação das Nanopartículas de Ouro	63
3.6.1		60
362	Radiomarcação direta	03
0.0.2	Radiomarcação direta	63
4	Radiomarcação direta Radiomarcação indireta RESULTADOS E DISCUSSÃO	63 65
4 4.1	Radiomarcação direta Radiomarcação indireta RESULTADOS E DISCUSSÃO Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro	63 65 65
<b>4</b> <b>4.1</b> 4.1.1	Radiomarcação direta Radiomarcação indireta <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> <b>Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro</b> Espectrofotometria UV-Visível	63 65 65 65
<b>4</b> <b>4.1</b> 4.1.1 4.1.2	Radiomarcação direta Radiomarcação indireta <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> <b>Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro</b> Espectrofotometria UV-Visível Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH	63 63 65 65 65 67
<b>4</b> <b>4.1</b> 4.1.1 4.1.2 4.1.3	Radiomarcação direta Radiomarcação indireta <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> <b>Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro</b> Espectrofotometria UV-Visível Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH Rendimento da Síntese por Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)	<ul> <li>63</li> <li>63</li> <li>65</li> <li>65</li> <li>65</li> <li>67</li> <li>71</li> </ul>
<b>4</b> <b>4.1</b> 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4	Radiomarcação direta Radiomarcação indireta <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> <b>Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro</b> Espectrofotometria UV-Visível Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH Rendimento da Síntese por Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	<ul> <li>63</li> <li>63</li> <li>65</li> <li>65</li> <li>67</li> <li>71</li> <li>72</li> </ul>

4.1.6	Eletroforese SDS-PAGE	84
4.2	Avaliação da Citotoxicidade	85
4.2.1	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	85
4.2.2	Toxicidade <i>in vivo</i> : peixe zebra - Zebrafish	90
4.3	Estudo <i>in vitro</i> da internalização Celular das EGCG-AuNPs:	
	CytoVIVA	96
44	Radiomarcação das Nanopartículas de Ouro	97
4.4.1	Radiomarcação direta com <sup>99m</sup> Tc	97
4.4.2	Radiomarcação indireta com <sup>99m</sup> Tc	98
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	APÊNDICE A - Materiais e Reagentes	114
	APÊNCICE B - Equipamentos	119
	APÊNCICE C - Produção acadêmica durante o período de	
	doutoramento: 2016-2020	127

# LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

- cm centímetro
- µm micrometro
- nm nanômetro
- L Litro
- mL mililitro
- µL microlitro
- **kg –** quilograma
- **g –** Grama
- **mg –** miligrama
- **μg –** micrograma
- % porcentagem
- °C grau Celsius
- **rpm** rotação por minuto
- opm órbita por minuto
- MeV Mega elétron volt
- **kGy –** quilo Gray

# LISTA DE FIGURAS

-	
Figura 1. Capa do livro Panacea Aurea: Sive Tractatus Duo	
De Ipsius Auro Potabili do Dr. Doutor Francisco Antonii em 1618	23
Figura 2. Taça de Lycurgus a) reflexão da luz b) transmissão da luz	25
Figura 3. Nanopartículas de ouro de vários tamanhos e formas com	
aplicações potenciais em biomedicina. nanoesferas pequenas	
(a) e grandes (b), (c) nanobastões, (d) nanobastões afiados,	
(e) nanoconchas, (f) nanocages/jaulas, (g) nanoesferas ocas,	
(h) tetraedros / octaedros / cubos / icosaedros , (i) dodecaedro rômbico,	
(j) octaedro, (k) nanocubos côncavos, (l) tetraexaedro,	
(m) dodecaedro rômbico, (n) bipirâmides triangulares obtusas,	
(o) tris octaedros e (p) nanoprismas.	28
Figura 4. A interação das ondas eletromagnéticas com os elétrons	
superficiais das AuNPs induz a ressonância plasmônica de superfície.	
Representação esquemática de como a interação das ondas	
eletromagnéticas com os elétrons de superfície nas NPs metálicas geram	
ressonância plasmônica de superfície	30
Figura 5. Nanopartículas de ouro comumente aplicadas em aplicações	
biomédicas. (a) Nanobastões de ouro, (b) nanopartículas de núcleo-casca	
de sílica-ouro e (c) nanocages de ouro. A cor intensa dessas nanopartículas	
surge da excitação coletiva de seus elétrons de condução, ou ressonância	
plasmônica de superfície, o que resulta na absorção de fótons em	
comprimentos de onda que variam com (a) razão de aspecto,	
(b) espessura da camada e / ou (c) deslocamento galvânico pelo ouro	31
Figura 6. Aplicações biomédicas de AuNPs. Devido às suas propriedades	
físico-químicas, ópticas e eletrônicas únicas, AuNPs têm sido exploradas	
para uma ampla gama de aplicações em diagnóstico, imagem, terapia e	
liberação de fármacos, genes, proteínas e peptídeos	39

<b>Figura 18.</b> Curvas de tamanho das EGCG-AuNPs x pH (a) e tamanho x [NaCl](b)
<b>Figura 19.</b> Curva de tamanho (nm) x pH obtida por DLS das EGCG-AuNPs-ASHɣ77
<b>Figura 20.</b> Imagens obtidas por MET, magnificação de 60kx: (a) EGCG-AuNPs e (b) EGCG-AuNPs-ASHɣ78
<b>Figura 21.</b> Imagem obtida por MET de EGCG-AuNPs e a obtenção do diâmetro médio das nanopartículas aferido com a utilização das ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3 <sup>®</sup>
<ul> <li>Figura 22. Imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão (magnificação 240kx para a, b, c e 200kx para d: (a) EGCG-AuNPs,</li> <li>(b) e (c) EGCG-AuNPs-ASHy em diferentes contrastes do equipamento;</li> <li>(d) EGCG-AuNPs-ASHy recoberta com acetato de uranila (UO<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>80</li> </ul>
<b>Figura 23.</b> Eletroforese com gel de poliacrilamida 12% das amostras de ASH- 0,1% (1A); ASHɣ-0,1% (2A); ASH-0,5% (1B); ASHɣ-0,5% (2B); EGCG-AuNPs- ASH-0,1% (1C); EGCG-AuNPs-ASHɣ-0,1% (2C); EGCG-AuNPs-ASH-0,5% (1D); EGCG-AuNPs-ASHɣ-0,5% (2D); EGCG-AuNPs (C=Controle) e marcador com pesos moleculares conhecido (M)
<b>Figura 24.</b> Curvas de viabilidade celular (%) em função da concentração das nanopartículas EGCG-AuNPs e o respectivo agente redutor EGCG no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro em células do tecido conjuntivo de camundongo, linhagem NCTC-L929 (CCIAL 020)
<b>Figura 25.</b> Curvas de viabilidade celular (%) em função da concentração das nanopartículas EGCG-AuNPs sem proteína, com ASB e ASH, irradiadas a 10 kGy, não irradiadas e, os controles negativos (PEAD) e positivo (látex) no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro em células do tecido conjuntivo de camundongo, linhagem NCTC-L929 (CCIAL 020)

Figura 26. Gráfico da viabilidade celular pelo método colorimétrico do
MTS das linhagens celulares V79-4 ( células de tecido pulmonar de
hamster chinês macho); MDA-MB 231 (carcinoma de mama) e PC3
(câncer de próstata humano), expostas às nanopartículas de ouro
(EGCG-AuNPs) na proporção 1:1 (NPs:DMEM) e aos controles
negativo e positivo, DMEM e DMSO respectivamente89
Figura 27. Taxa de letalidade do peixe-zebra no estágio embrião-larval
exposto EGCG e EGCG-AuNPs durante período de 96 horas91
Figura 28. Imagens obtidas por microscopia óptica: (A) Larva controle tratada
eclodiu com 96 horas pós fecundação (hpf); (B) o embrião exposto ao
fitoquímico EGCG na concentração de 92,5 µg.mL <sup>-1</sup> não eclodiu com 96 hpf,
mostrando o atraso significativo na eclosão das larvas de peixe zebra92
Figura 29. Taxa de letalidade do peixe-zebra no estágio embrião-larval
sem córion exposto às EGCG-AuNPs durante período de 96 horas94
Figura 30. Ensaio modificado de FET por microinjeção em embriões de
peixe zebra expostos a concentração de EGCG-AuNPs e EGCG, bem
como controles: controle-H <sub>2</sub> O) e controle por lesão da microinjeção)95
Figura 31. Imagem da linhagem de células de câncer de mama humano
(MDA-MB 231) após 2 horas de exposição às nanopartículas de ouro
(EGCG-AuNPs), (a) Imagem em tamanho real com a escala em μm e
(b) imagem ampliada97

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos por ICP OES da concentração e %
de Au nas soluções durantes as etapas de síntese71
Tabela 2. Valores obtidos por DLS e Potencial-Z das
EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASH-y73
Tabela 3. Valores dos parâmetros medidos por meio das ferramentas do
software DigitalMicrographiGMS3 <sup>®</sup> na avaliação de imagens de microscopia
eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de ouro funcionalizadas
com albumina via radiação gama (EGCG-AuNPs-ASHγ)81
Tabela 4. Valores dos parâmetros medidos por meio das ferramentas
do software DigitalMicrographiGMS3 <sup>®</sup> na avaliação de imagens de
microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro82
Tabela 5. Valores obtidos utilizando os parâmetros aferidos por MET das
AuNPs e o volume da célula unitária da estrutura cristalina do ouro
Tabela 6. Valores obtidos por ICP OES para concentração de Au
contido na solução de EGCG-AuNPs e valores inferidos da
concentração de nanopartículas83
<b>Tabela 7.</b> Taxa de eclosão de larvas de peixe zebra às 48, 72 e 96 horas
durante a exposição ao EGCG92
Tabela 8. Resultados obtidos do ensaio de toxicidade aguda com
embriões de peixe zebra sem córion94

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AFM Atomic Force Microscopy Microscópio de Força Atômica
- ASTM American Society for Testing and Materials
- AgNPs Nanopartículas de Prata
- AuNPs Nanopartículas de Ouro
- CuNPs Nanopartículas de Cobre
- DLS Dynamic Light Scattering Espalhamento Dinâmico de Luz
- FeNPs Nanopartículas de Ferro
- FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- FTIR Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
- ICP-OES Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente
- MEV Microscópio Eletrônico de Varredura
- MET Microscópio Eletrônico de Transmissão
- UV-Vis Ultravioleta-Visível
- **ISO** International Organization for Standardization
- PBS Sigla em inglês para tampão fosfato salina

# 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer está entre as principais causas de morte, depois apenas de doenças cardiovasculares e respiratórias. É uma doença em que as células se multiplicam de modo desordenado, afetando a função de órgãos e tecidos, podendo invadir e prejudicar outras estruturas além da de origem. Há uma variedade enorme de cânceres que acometem os seres humanos. Os mais comuns são os cânceres de mama e próstata, mas os que mais levam a óbito são o de pulmão, o de estômago e o colorretal. O câncer pode ser causado por vários fatores, dentre eles a predisposição genética, infecções, o uso ou contato com substâncias químicas com potencial carcinogênico, a exposição física à radiação ionizante, hábitos de vida como o sedentarismo, alimentação, qualidade do sono, uso de drogas de abuso e fármacos mitogênicos, anabolizantes, entre outros <sup>1-3</sup>.

A aplicação médica da nanotecnologia é uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de novas formas de tratamento e diagnóstico de câncer. A nanotecnologia é um ramo da ciência que estuda a manipulação da matéria em escala atômica e molecular, associada a diversas áreas de pesquisa, como a medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia, engenharia dos materiais, tecnologia nuclear, dentre outras <sup>4</sup>.

As nanopartículas, comumente definidas como partículas com tamanho que varia de 1 a 100 nm em duas ou três dimensões, podem ser usadas como sistemas avançados de liberação de quimioterápicos e radiofármacos e no reparo de danos teciduais e celulares. Diferentes abordagens baseadas em nanotecnologia podem ser usadas para aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais, ocorre а redução frequência pois da posológica е consequentemente diminuição do nível de toxicidade dos tratamentos oncológicos 5-8

Se por um lado o desenvolvimento da nanotecnologia pode trazer avanços incríveis, por outro, muitos cientistas temem que isso possa gerar catástrofes ambientais, biológicas e econômicas. Isso porque alguns elementos pouco reativos em escala normal podem se tornar extremamente perigosos em nanoescala. Neste

sentido, a nanotecnologia verde vem sendo considerada uma vertente da nanotecnologia que tem como objetivo mitigar esses impactos a partir do desenvolvimento de protocolos para gerar produtos e processos de produção sustentáveis <sup>9,10</sup>.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam características importantes para utilização na pesquisa, diagnóstico e tratamento do câncer devido a sua natureza de espalhamento de luz única e propriedades fototérmicas <sup>11</sup>. As AuNPs são nanoestruturas consideradas como teranóstico, esse termo é utilizado hoje como a combinação de um biomarcador preditivo com um agente terapêutico <sup>12</sup>. Estudos realizados nos últimos anos apresentam o desenvolvimento de novos protocolos para a síntese, estabilização e funcionalização de nanopartículas de ouro com potencial teranóstico (terapia e diagnóstico) de diversos tipos de câncer utilizando entre outras abordagens a nanotecnologia verde e aplicação da radiação ionizante <sup>13,14</sup>.

Sendo assim, a proposta do presente estudo foi de sintetizar e estabilizar nanopartículas de ouro utilizando fitoquímicos, e assim tornar o processo reprodutível. Ensaios de citotoxicidade e ecotoxicidade foram realizados com a finalidade de garantir o uso seguro em testes pré-clínicos visando a futura aplicação clínica das AuNPs.

## 1.1 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi desenvolver nanopartículas de ouro por meio da nanotecnologia verde, funcionalizadas com albumina via radiação ionizante e verificar a citotoxicidade e o potencial para aplicação na terapia e/ou diagnóstico para câncer.

# 1.2 Justificativa

Grupos e institutos de pesquisas ao redor do mundo unem forças para o desenvolvimento de novos protocolos para a síntese, estabilização e funcionalização de nanopartículas de ouro para o tratamento e diagnóstico de

diversos tipos de câncer utilizando entre outras abordagens a nanotecnologia verde.

O Brasil, é um país emergente, que há anos se esforça para dominar a tecnologia nuclear. Um novo reator multipropósito está em construção para que seja possível atender a demanda crescente de radionuclídeos usados no tratamento e diagnóstico dessa doença que assola a humanidade. Vale ressaltar que a área de medicina nuclear não se destina apenas a oncologia, pois diversos radiofármacos são aplicados a doenças cardiovasculares, inflamatórias, infecciosas, degenerativas e genéticas.

A originalidade desse estudo se dá pelo desenvolvimento de uma nova nanopartícula de ouro funcionalizada com albumina via radiação gama. As propriedades únicas das nanopartículas de ouro aliada às características intrínsecas das proteínas permitem produzir inúmeros compostos nanoestruturados com potencial aplicação na nanomedicina. A funcionalização das AuNPs com albumina é justificada pela afinidade dessa proteína com os receptores glicoproteicos GP60, que por sua vez, são encontrados em diversas células tumorais, além de contribuir potencialmente com a cinética das nanopartículas de ouro também pode ser aplicada como carreadoras de fármacos.

A combinação da energia das radiações ionizantes possibilita a reticulação de nanoestruturas sem necessitar de agentes químicos comumente tóxicos, como os compostos tióis usados com frequência como ligantes ou reticulantes em reações de funcionalização de nanopartículas. Outra vantagem do uso da radiação ionizante na produção de nanomateriais para aplicações biomédicas é a esterilização simultânea de acordo com a dose, nível de contaminação inicial e características do meio e do material.

## 2.1 História

O ouro foi um dos primeiros metais descobertos pelos humanos. As primeiras menções a respeito de coloides de ouro apareceram nos séculos IV e V a.C. em tratados médicos chineses, arábicos e indianos. Os chineses o chamavam de "solução de ouro" e os indianos de "ouro líquido". Na idade média, alquimistas da Europa estudaram e utilizaram o ouro coloidal (OC). Provavelmente, pelas diferentes colorações obtidas por meio da redução de sais de ouro, os alquimistas começaram acreditar na transformação dos elementos. Paracelso escreveu sobres as propriedades terapêuticas em *quinta essentia auri*, o qual ele obteve por meio da redução do cloreto áurico com álcool e extrato de óleos vegetais, denominado por ele como ouro potável (*potable gold*) e usado no tratamento de algumas desordens mentais e sífilis. Seu contemporâneo Giovanni Andrea utilizava o *aurum potabile* nos tratamentos de lepra, úlceras, epilepsia e diarreia. O primeiro livro encontrado e conservado até os dias de hoje sobre ouro coloidal (figura 1), foi publicado pelo Doutor Francisco Antonii em 1618<sup>15</sup>.

**Figura 1.** Capa do livro Panacea Aurea: Sive Tractatus Duo De Ipsius Auro Potabili do Dr. Doutor Francisco Antonii em 1618.



Fonte: Anthony, F. 1618<sup>15</sup>.

Na história da ciência, as soluções coloidais de ouro ou nanopartículas de ouro (AuNPs), como conhecemos hoje, foram estudadas por Michael Faraday em 1857. Ele publicou um artigo sobre as propriedades e os métodos de sínteses de ouro coloidal. Faraday descreveu pela primeira vez o processo de agregação do ouro coloidal na presença de eletrólitos e como compostos de alta massa molecular podem exercer um efeito estabilizante, impedindo a agregação das partículas; também descreveu as propriedades de filmes finos de ouro coloidal. Coloides de ouro preparados por Faraday ainda permanecem guardados no Royal Institution da Grã-Bretanha em Londres <sup>16</sup>.

Em 1898, foi publicado o artigo fundamental sobre as propriedades das soluções coloidais de ouro. Zsigmondy descreveu pela primeira vez métodos de síntese com partículas de tamanhos diferentes utilizando peróxido de hidrogênio, formaldeído e fósforo branco como agentes redutores, também relatou a importância das propriedades físico-químicas, inclusive as propriedades ópticas das soluções coloidais de ouro <sup>17</sup>.

Estudos realizados por Theodor Svedberg, laureado com prêmio Nobel de química em 1926 (inventor da ultracentrífuga), contribuíram com a elucidação dos mecanismos de formação e as propriedades de sedimentação do OC. Em seus estudos, Svedberg investigou a cinética de redução dos haletos de ouro e formulou os principais conceitos sobre o método de condensação química das partículas de OC <sup>18</sup>. Em 1980, injeções intravenosas de OC foram apresentadas como *gold cure* para o tratamento de alcoolismo <sup>19</sup>.

#### 2.2 Nanotecnologia

A Nanotecnologia é uma área da ciência que analisa as inovações em relação aos materiais de dimensões em escala nanométrica <sup>20</sup>. A dimensão física é representada por uma unidade equivalente à bilionésima parte do metro (símbolo nm, 10<sup>-9</sup> m). É definida pela American Society for Testing and Materials (ASTM) como o planejamento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas de tamanho e forma controlada em escala nanométrica <sup>21</sup>. Portanto, algumas propriedades dos nanomateriais diferem dos macro materiais porque, em nanoescala, fenômenos quânticos são mais evidentes. A

nanotecnologia, tornou-se uma ferramenta importante para propor soluções para os problemas e déficits de alimentos, energia, meio ambiente e saúde enfrentados pela humanidade.

Por mais que a nanotecnologia seja considerada como tecnologia do século XX, na prática a nanotecnologia teve início na antiguidade. As nanopartículas (NPs) têm sido usadas, mesmo que não intencionalmente, por milhares de anos. Nesse sentido, as NPs têm sido utilizadas em vários campos, como coloração de vidro e vitrais, produção de porcelana ou construção civil <sup>22</sup>. Um dos principais exemplos dessa aplicação é a taça de Lycurgus, confeccionada com NPs em Roma no século IV. Devido às nanopartículas de ouro (AuNPs) adicionadas ao vidro, a taça possui uma característica de fotocroísmo de acordo com a reflexão e transmissão da luz que é mostrada na figura 2<sup>23</sup>.



Figura 2. Taça de Lycurgus a) reflexão da luz b) transmissão da luz <sup>23</sup>.

Fonte: FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, C. (2007) 23.

Dentre as definições, a mais comum, define nanopartículas (NPs) como partículas com tamanho que varia de 1 a 100 nm em duas ou três dimensões. É válido mencionar que o tamanho da partícula e a sua distribuição estão entre as características mais importantes, uma vez que determinam o efeito biológico, a toxicidade, o direcionamento a sítios específicos, a capacidade de sistemas de liberação, a farmacocinética e a farmacodinâmica das NPs <sup>5,7,20</sup>.

A visão de Richard Phillips Feynman, que questionou em um encontro anual da Sociedade Americana de Física em 1959 "por que nós não escrevemos uma enciclopédia de 24 volumes no topo da cabeça de um alfinete", pode ser considerada um ponto de partida para os desenvolvimentos das tecnologias de computador e armazenamento desenvolvidas por nanotecnologia na atualidade <sup>24</sup>. O físico americano é considerado o pai da nanotecnologia. Nascido em Manhattan em 1918, Feynman se formou aos 21 anos no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT) e logo iniciou a pós-graduação, onde ele descreve a Física Quântica de maneira diferenciada. Fez parte do projeto que desenvolveu a bomba atômica no período da 2ª Guerra Mundial, ganhou prêmio Nobel em 1965 pelos trabalhos em Eletrodinâmica Quântica, contribuiu com trabalhos importantes na sua área de atuação, Física das Partículas, bem como em outras áreas da Física <sup>25</sup>.

Em 1974, Norio Taniguchi usa pela primeira vez em uma conferência a palavra "Nano", que significa "anão" (em grego), originando o termo "Nanotecnologia". Os desenvolvimentos tecnológicos mais impactantes realizados após o discurso de Feynman sobre a possibilidade de se "ver e manipular" átomos são a observação de nanoestruturas por meio do microscópio de varredura por tunelamento. Criado em 1981 pelos cientistas da IBM (International Business Machines) Gerd Binning e Heinrich Rohrer, a invenção foi utilizada para escrever o logotipo da IBM por meio da organização de átomos de xenônio sobre uma superfície de níquel <sup>26</sup>.

Em 1985 foram descobertas esferas de carbono que foram chamadas de Fulerenos, constituídas exclusivamente por 60 átomos de carbono (C60) <sup>27</sup>. Os microscópios de varredura de tunelamento eram úteis apenas para analisar materiais condutores, enquanto os microscópios de força atômica são capazes de analisar materiais não condutores <sup>26</sup>.

A aplicação médica da nanotecnologia é uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de novas formas de tratamento e diagnóstico de câncer. Essa

tecnologia ampliou o horizonte da ciência dos materiais, possibilitando a descoberta e desenvolvimento de materiais nanoestruturados, com o intuito de melhorar e obter diferentes propriedades físicas e químicas daquelas encontradas nos dispositivos desenvolvidos em escalas maiores. Dentre estas estão o aumento da área de superfície em relação ao volume, possibilidade de internalização em células e estruturas celulares, aumento da capacidade de atravessar as barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica, dentre outras <sup>28,29</sup>.

#### 2.3 Nanopartículas de Ouro

Partículas de ouro sintetizadas desde a época de Faraday vêm gerando um grande interesse, visto que a capacidade de as sintetizar de forma controlada e sua aplicação em diversos nanosistemas surgiram nas últimas décadas <sup>30,31</sup>.

Atualmente, a nanotecnologia está permitindo que o ouro ajude a resolver problemas globais críticos, desde o tratamento do câncer até as mudanças climáticas <sup>32</sup>. Nanopartículas de ouro têm ganhado interesse crescente devido às suas características especiais, como propriedades ópticas e eletrônicas extraordinárias, alta estabilidade e compatibilidade biológica, morfologia controlável e dispersão de tamanho e formas (figura 3) e de fácil funcionalização da superfície <sup>33</sup>.

**Figura 3.** Nanopartículas de ouro de vários tamanhos e formas com aplicações potenciais em biomedicina. nanoesferas pequenas (a) e grandes (b), (c) nanobastões, (d) nanobastões afiados, (e) nanoconchas, (f) nanocages/jaulas, (g) nanoesferas ocas, (h) tetraedros / octaedros / cubos / icosaedros, (i) dodecaedro rômbico, (j) octaedro, (k) nanocubos côncavos, (l) tetraexaedro, (m) dodecaedro rômbico, (n) bipirâmides triangulares obtusas, (o) tris octaedros e (p) nanoprismas <sup>33</sup>.

![](_page_28_Figure_1.jpeg)

Fonte: DREADEN, E.C.; ALKILANY, A.M.; HUANG, X.; MURPHY, C.J.; EL-SAYED, M.A. (2012) <sup>33</sup>.

### 2.4 Características eletrônicas das AuNPs

As principais características incluem as propriedades elétricas, químicas e ópticas. A propriedades ópticas das AuNPs são interessantes porque sua absorção e emissão do comprimento de onda estão dentro do espectro eletromagnético que compreendem interações nos comprimentos de onda do infravermelho, visível e ultravioleta e por causa de suas propriedades dependentes de tamanho e forma <sup>34</sup>.

Em particular, o processo de extinção de luz ocorre na faixa do infravermelho ao UV-visível, quando uma onda eletromagnética passa através de uma partícula de metal excitando a superfície eletrônica ou estados vibracionais <sup>35</sup>. Este fenômeno induz momentos de dipolo que oscilam na respectiva frequência da onda incidente e, portanto, dispersam a radiação secundária. Esta oscilação coletiva dos elétrons de condução livre é chamada de ressonância plasmônica de superfície. Os *plasmons* de superfície são oscilações de cargas coletivas que ocorrem na interface entre os condutores e os dielétricos (figura 4). A oscilação da frequência está geralmente na região visível, dando origem à forte absorção da ressonância de plasmônica de superfície <sup>34, 36-39</sup>. Os *plasmons* de superfície podem assumir várias formas, desde a propagação livre de ondas de elétrons de densidade ao longo das superfícies metálicas para oscilações eletrônicas localizadas nas nanopartículas de metal (NPs) <sup>35,40</sup>.

A luz nas NPs induz os elétrons de condução a oscilar coletivamente com uma frequência ressonante que depende do tamanho, forma, composição, distância interpartículas e ambiente (propriedades dielétricas). Como um resultado desses modos, as nanopartículas absorvem e espalham a luz tão intensamente que são facilmente observadas utilizando microscopia de campo escuro (espalhamento óptico) <sup>41-43</sup>. **Figura 4.** A interação das ondas eletromagnéticas com os elétrons superficiais das AuNPs induz a ressonância plasmônica de superfície. Representação esquemática de como a interação das ondas eletromagnéticas com os elétrons de superfície nas NPs metálicas geram ressonância plasmônica de superfície <sup>44</sup>.

![](_page_30_Figure_1.jpeg)

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

O tamanho das NPs tem influência sobre muitas das propriedades físicas e químicas, incluindo luminescência, condutividade e atividade catalítica. AuNPs dão origem à absorção e espalhamento cujas proporções dependem do tamanho da AuNP, espessura do recobrimento, razão de aspecto, forma e concentração de ouro <sup>45</sup> (figura 5). AuNPs com um diâmetro menor que 20 nm essencialmente mostram absorção, mas quando o tamanho aumenta para 80 nm também aumenta a razão de espalhamento para absorção. Conforme o tamanho do AuNP aumenta, a luz não pode mais polarizar as nanopartículas homogeneamente, e os modos de ordem superior com menor energia se tornam predominantes. Isso causa um desvio para o vermelho e alargamento da banda plasmônica de superfície. AuNPs pequenas, como aquelas com 13 nm de diâmetro absorvem a luz verde, que corresponde a uma forte banda de absorção em 520 nm no espectro de luz visível. No entanto, as soluções de AuNPs aparecem na cor vermelha. Para AuNPs menores (ou seja, 5 nm de diâmetro), os elétrons de superfície são oscilados pela luz que entra em um modo dipolo, mas a ressonância plasmônica de superfície é muito sensível à composição, tamanho, forma, distância entre partículas e ambiente (propriedades dielétricas) das AuNPs <sup>40,43</sup>.

**Figura 5.** Nanopartículas de ouro comumente aplicadas em aplicações biomédicas. (a) Nanobastões de ouro, (b) nanopartículas de núcleo-casca de sílica-ouro e (c) nanocages de ouro. A cor intensa dessas nanopartículas surge da excitação coletiva de seus elétrons de condução, ou ressonância plasmônica de superfície, o que resulta na absorção de fótons em comprimentos de onda que variam com (a) razão de aspecto, (b) espessura da camada e / ou (c) deslocamento galvânico pelo ouro <sup>33</sup>.

![](_page_31_Figure_1.jpeg)

**Fonte:** DREADEN, E.C.; ALKILANY, A.M.; HUANG, X.; MURPHY, C.J.; & EL-SAYED, M.A. (2012) <sup>33</sup>.

Isso também explica os correspondentes deslocamentos de banda plasmônica de superfície (desvio para o vermelho), o que resulta em mudanças de cor (vermelho para roxo) que são observadas durante a agregação de pequenas AuNPs. Quando AuNPs agregam, seus *plasmons* de superfície se combinam (acoplamento de *plasmon* interpartículas), e o agregado pode ser considerado como uma única partícula grande, apesar de descrito na literatura, o acoplamento de *plasmon* interpartículas é bastante complexo e dependente de muitos fatores, como morfologia, agregação e densidade de nanopartículas <sup>40,43</sup>.

### 2.5 Métodos de sínteses de nanopartículas de ouro

Os métodos de sínteses de AuNPs ouro e outros coloides metálicos podem ser divididos em dois grupos: métodos de dispersão e métodos de condensação.

## 2.5.1 Métodos de dispersão (top-down)

Os métodos de dispersão para sintetizar AuNPs são baseados na destruição de um cristal de ouro metálico por meio da aplicação de um campo elétrico de alta voltagem ou ablação a laser. A formação de nanopartículas de ouro ocorre por meio da formação de um arco elétrico entre dois eletrodos de ouro metálico imerso em meio líquido, levando ao um evento de transferência de massa, na qual ocorre a formação do coloide metálico <sup>46</sup>.

O rendimento, o tamanho e a morfologia das AuNPs formadas pelos métodos de dispersão dependem da voltagem aplicada entre os eletrodos, da 'intensidade da corrente e da presença de eletrólitos em solução. A aplicação de corrente direta leva a formação não uniforme das NPs. O uso de álcalis ou cloretos e a aplicação de corrente alternada de alta frequência nos métodos de dispersão auxiliam no controle da síntese e na obtenção de NPs de qualidade <sup>46</sup>.

#### 2.5.2 Métodos de condensação (*bottom-up*)

Os métodos de condensação costumam ser mais usados do que os métodos de dispersão. Esse método baseia-se na redução de haletos de ouro, como por

exemplo HAuCl<sub>4</sub>, utilizando agentes redutores ou por meio da aplicação de radiação ultravioleta, raios X e gama, ultrassom e radiólise de pulso ou laser. Diversos compostos inorgânicos e orgânicos podem ser utilizados como agente redutor. Na literatura são descritos vários métodos para esse tipo de síntese, um dos mais utilizados é o método de Turkevich, no qual o citrato é usado como agente redutor, e o de Brust. O princípio básico de ambos os métodos para a síntese de AuNPs por redução é a utilização de um agente redutor capaz de reduzir o ouro Au<sup>3+</sup> em Au<sup>0 47,48</sup>.

O método de Turkevich foi o primeiro método estabelecido e publicado em 1951. Utiliza o citrato de sódio como agente redutor e estabilizante de nanopartículas de ouro em dispersões coloidais <sup>47</sup>. Já método Brust utiliza condições adversas, como a aplicação de boro-hidreto de sódio para reduzir o Au<sup>3+ 48</sup>. Este é considerado um método eficiente de produção de AuNPs, mas é inadequado na presença de peptídeos, uma vez que o boro-hidreto de sódio reduz os grupos funcionais presentes nos esqueletos peptídicos, diminuindo ou eliminando a especificidade das biomoléculas no direcionamento a alvos específicos. O método de redução por boro-hidreto de sódio e o uso de tióis para estabilizar as nanopartículas de ouro a partir de ligações químicas fortes (tiol-ouro) forma AuNPs altamente estáveis. As AuNPs estabilizadas por moléculas com grupos tióis perdem a característica potencial de serem funcionalizadas ou sensibilizadas para liberação de fármacos, incluindo peptídeos, proteínas e vários vetores bioquímicos que são normalmente usados para direcionar AuNPs na terapia e diagnóstico de neoplasias <sup>31,49</sup>.

No preparo de AuNPs com tamanho e forma controlada, geralmente se utiliza ambos os métodos, o de Turkevich e o de Brust como por exemplo para sintetizar nanobastões de ouro. Outros métodos foram desenvolvidos com base no uso de sistemas de solventes durante a produção de nanopartículas. Apesar de se tratar de métodos eficientes de produção, principalmente no controle da nucleação, permitindo controlar o tamanho e a forma geométrica das AuNPs, são ecologicamente inviáveis, exigindo processos de purificação onerosos, além de ter as desvantagens relacionadas à estabilidade, reatividade e biocompatibilidade caso haja concentração residual de solventes nocivos <sup>30,31,50,51</sup>.

A obtenção de AuNPs com propriedades desejáveis, tais como tamanho, forma e funcionalização de superfície, é possível a partir da alteração de algumas

variáveis, como os reagentes e agentes estabilizantes utilizados na síntese, concentração molar das espécies químicas envolvidas, temperatura, pH, velocidade de agitação e tempo de reação ou exposição <sup>47,48,51</sup>.

## 2.6 Nanotecnologia verde - Green Nanotechnology

A nanotecnologia verde é a vertente da nanotecnologia que tem como objetivo o desenvolvimento de protocolos para gerar produtos e processos de produção sustentáveis, de maneira a minimizar o uso de compostos tóxicos, os custos e o descarte apropriado dessas substâncias químicas. O intuito é diminuir os impactos ambientais gerados tanto no processo de produção como na utilização e descarte dos produtos <sup>52-54</sup>.

Muitos vegetais possuem antioxidantes em seus caules, folhas, flores, frutos, raízes e sementes. A maioria dessas substâncias antioxidantes naturais não são tóxicas para o organismo nem para o meio ambiente; são utilizadas há séculos pelos humanos tanto na alimentação como para fins terapêuticos. Vários estudos demonstram que é possível sintetizar AuNPs utilizando fitoquímicos (substâncias derivadas do metabolismo secundário dos vegetais) como agentes redutores e minimizar ou eliminar o uso de agentes químicos tóxicos. Na literatura, vários autores reportam o uso de fitoquímicos derivados da soja, do chá verde e da canela capazes de desempenhar ambas as funções, tanto a de agente redutor e como a de agente estabilizante na síntese de AuNPs <sup>52,55-57</sup>. No presente estudo, o fitoquímico escolhido como agente redutor e estabilizante foi o epigalocatequina-3-galato, um dos principais componentes do chá verde.

#### 2.6.1 Catequinas e Polifenóis do Chá:

O chá verde é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Atualmente, a *Camellia sinensis* (nome científico do chá verde) é utilizada não só para o desenvolvimento de vários extratos de alimentos, como também de produtos nutracêuticos, cosméticos e medicamentos. Uma série de estudos envolvendo o composto isolado epigalocatequina-3-O-galato (EGCG) demonstrou a atividade antioxidante mais potente dentre a fração de polifenóis sintetizados pela planta <sup>53,55,56,58</sup>.

O EGCG pode ser utilizado na composição de géis, cremes, loções e xampus para humanos e animais, produtos para cuidados com os pés, sabonetes, pasta de dentes, repelentes contra insetos e desinfetantes. As catequinas e seus derivados são utilizados por contribuírem para os efeitos benéficos atribuídos ao chá. Catequinas e polifenóis do chá são eficazes inibidores de espécies reativas de oxigênio *in vitro* e podem também funcionar como antioxidantes indiretamente através dos seus efeitos sobre os fatores de transcrição e atividade enzimática. Uma revisão extensa feita por Higdon e Frei, descreve os benefícios à saúde associados ao consumo do chá, o metabolismo e o potencial antioxidante das catequinas e polifenóis <sup>53</sup>.

Os mecanismos de ação de vários agentes quimiopreventivos da dieta ganharam considerável atenção na pesquisa do câncer. Diversas pesquisas foram realizadas para elucidar os mecanismos moleculares da quimioprevenção do câncer pelo chá verde e a principal catequina o EGCG. Vários mecanismos para explicar os potenciais quimiopreventivos do EGCG têm sido apresentados, entre os quais seu efeito em vias de sinalização celular específicas tem recebido considerável atenção por regular a proliferação e apoptose celular <sup>59</sup>. O EGCG, além de outros mecanismos, em dose humana alcançável, é conhecido por ativar sinais de morte celular e induzir apoptose em células pré-cancerosas ou cancerosas, resultando na inibição do desenvolvimento e/ou progressão do tumor. É importante ressaltar que esses efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos do EGCG demonstraram ser seletivos para células cancerígenas, pois as células normais não foram afetadas pelo seu tratamento. Em células cancerosas, EGCG também causa inibição da atividade de tirosina quinases receptoras específicas e vias relacionadas a jusante de transdução de sinal <sup>60,61</sup>.

# 2.7 Nanomedicina e o Câncer

O câncer é uma doença que desregula o processo básico de vida na célula, em quase todos os casos, alterando genes relacionados ao ciclo celular ou outros que influenciam na sobrevivência do tecido, produzindo o crescimento celular
desordenado das células cancerosas, podendo invadir outros tecidos de acordo com as características do câncer. A causa das alterações genéticas podem ser: mutação (modificação) de um ou mais genes; mutação de um grande segmento de um filamento de DNA (ácido desoxirribonucleico), contendo muitos genes; adição ou perda de grandes segmentos cromossômicos. Com o avanço da tecnologia e consequente aumento da longevidade, o câncer passou a ocorrer com maior incidência. Atualmente, está entre as 3 mais frequentes causas de morte por enfermidade em nível mundial <sup>2,3</sup>.

As diferentes abordagens baseadas em nanotecnologia podem ser usadas para aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos que utilizam medicamentos, como os quimioterápicos, ou o uso de radionuclídeos tanto para tratamento como também em diagnósticos de tumores e câncer. Materiais nanométricos possuem propriedades únicas que podem melhorar a eficácia, pois ocorre a redução da frequência posológica e consequentemente diminuição do nível de toxicidade dos tratamentos oncológicos <sup>5,6</sup>.

A pesquisa e investigação de compostos e substâncias com propriedades adequadas, gerou uma gama de formas de veicular, liberar e controlar o tamanho das nanopartículas. Atualmente, podemos citar os lipossomas, os dendrímeros, as nanoemulsões, os nanotubos de carbono, polímeros e nanopartículas organometálicas <sup>8,62,63</sup>.

#### 2.8 Nanopartículas de ouro radioativas ou radiomarcadas

As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam características importantes para utilização biomédica, como, por exemplo, na pesquisa e diagnóstico do câncer devido à sua natureza de espalhamento de luz única e propriedades fototérmicas. As AuNPs têm sido estudadas exaustivamente nos últimos anos, o que viabilizou o desenvolvimento de uma variedade de agentes com potencial teranóstico (compostos com características que possibilitam aplicação simultânea na terapia e diagnóstico de câncer)<sup>11,64</sup>.

Na quimioterapia convencional, os agentes são pequenas moléculas que apresentam biodistribuição inespecífica, o que causa danos aos tecidos saudáveis, além de ficarem restritos a alguns tipos de mecanismos de resistência das células cancerosas, tais como a elevada quantidade de transportadores para fármacos expressos na membrana ou produção de enzimas capazes de metabolizar tais moléculas. O uso das AuNPs pode ser uma alternativa para mitigar ou solucionar esses problemas, uma vez que é possível funcionalizar a sua superfície utilizando moléculas com alta afinidade a sítios de ligação específica <sup>65</sup>. A irradiação das AuNPs utilizando feixe de luz no infravermelho próximo (*Near Infra Red - NIR*) produz calor, permitindo o desenvolvimento de sistemas de liberação sensíveis a essa condição, como os hidrogéis, tornando possível a entrega de fármacos a locais de interesse quando aplicado o feixe. Também podem ser radiomarcadas ou empregadas na forma de radionuclídeo (<sup>198</sup>Au/<sup>199</sup>Au), possibilitando a pesquisa de novos radiofármacos <sup>62,66,67</sup>.

Na última década, pesquisadores demonstraram uma metodologia eficiente para sintetizar e estabilizar AuNPs radioativas utilizando um agente redutor e estabilizante atóxicos. Esse estudo foi realizado a partir da redução de NaAuCl<sub>4</sub> pelo conjugado trimérico fosfina-alanina (THPAL, P(CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>COOH)<sub>3</sub>) na presença de goma arábica como agente estabilizante <sup>63</sup>. Roy e Lahiri produziram nanopartículas de <sup>198</sup>Au usando o princípio da nanotecnologia verde. Nesse método, as nanopartículas foram estabilizadas com polietilenoglicol (PEG 4000) <sup>68</sup>.

A funcionalização das nanopartículas é uma etapa muito importante para diminuir a toxicidade e direcioná-las a alvos específicos. Em 2010, um grupo de pesquisadores desenvolveu nanopartículas de ouro funcionalizadas com o peptídeo bombesina, escolhido devido sua alta afinidade pelos receptores de liberação de gastrina (GRP) *in vivo*. Esses receptores são expressos em altas quantidades pelas células de tumores de pulmão, próstata e mama <sup>63</sup>.

Estudos comprovam que a toxicidade pode ser alterada de acordo com o tipo de revestimento das partículas. Por esse motivo, costuma-se investigar a toxicidade de acordo com a concentração, tamanho, formato, carga de superfície, funcionalização da superfície e atividade nos casos de moléculas radioativas. Na literatura, já foi descrito o potencial da aplicação das nanopartículas de ouro no tratamento de tumores de próstata, mama e pâncreas <sup>69-73</sup>.

Em 2013, Luna et al. desenvolveram um estudo no qual o objetivo foi avaliar o potencial *in vitro* de AuNPs radiomarcadas com <sup>177</sup>Lu e conjugadas com ciclopeptídeos no tratamento fototérmico plasmônico e radioterapia direcionada em células de câncer de mama MCF7. Após a irradiação do laser, na presença das AuNPs funcionalizadas e radiomarcadas com <sup>177</sup>Lu, o tratamento causou um aumento na a temperatura do meio (50,5°C, comparado a 40,3°C sem AuNPs), resultando em uma diminuição significativa na viabilidade e proliferação celular de MCF7 <sup>74</sup>.

Nos EUA, pesquisadores estabeleceram um protocolo para a síntese de AuNPs radioativas, que foram desenvolvidas utilizando fitoquímicos como agentes redutores e estabilizantes. EGCG-<sup>198</sup>AuNPs foram sintetizadas utilizando o EGCG como agente redutor e estabilizante para converter o ouro radioativo em nanopartículas de ouro radioativas. O estudo realizado em 2012, foi demonstrado boa captação de EGCG-<sup>198</sup>AuNPs em tumores de próstata em roedores <sup>75</sup>. Esse estudo mostra que cerca de 70% da dose injetada de EGCG-<sup>198</sup>AuNPs ficou retida no tumor de próstata até 24 horas. Essa captação foi atribuída à alta afinidade das EGCG-198AuNPs pelos receptores do tipo laminina (Lam-67R), que são expressos em grandes quantidades pelas células do câncer de próstata <sup>52,55,75</sup>.

Uma alternativa aos métodos de condensação convencional é a síntese de nanopartículas metálicas utilizando a radiação ionizante. Trata-se de um método que não utiliza solventes orgânicos e pode ser considerado uma alternativa aos métodos químicos convencionais, com a vantagem para aplicação em Nanomedicina devido a possibilidade de síntese e esterilização simultânea. A síntese induzida por radiações ionizantes requer a utilização de agentes estabilizantes para prevenir a agregação e precipitação das nanopartículas <sup>14,76-78</sup>.

**Figura 6.** Aplicações biomédicas de AuNPs. Devido às suas propriedades físicoquímicas, ópticas e eletrônicas únicas, AuNPs têm sido exploradas para uma ampla gama de aplicações em diagnóstico, imagem, terapia e liberação de fármacos, genes, proteínas e peptídeos <sup>79</sup>.



Fonte: Adaptado de HER, S.; JAFFRAY, D.A.; ALLEN, C. (2017) 79.

# 2.9 Principais técnicas utilizadas em nanotecnologia: Caracterização físicoquímica de nanopartículas de ouro

### 2.9.1 Espectroscopia UV-Visível

Conceito: Radiação e energia

A radiação é uma forma de energia transmitida como ondas eletromagnéticas. É assim chamada porque possui campos elétricos e magnéticos que oscilam simultaneamente em planos mutuamente perpendiculares entre si. A radiação eletromagnética espacial tem natureza dual: exibe propriedades de onda e propriedades de partículas.

Absorção e Emissão de Radiação.

A radiação eletromagnética pode interagir com a matéria de várias maneiras. Se a interação resulta na transferência de energia de um feixe de energia radiante para a matéria, é chamada de "absorção". O processo reverso em que uma parte da energia interna da matéria é convertida em energia radiante é chamada de "emissão". Na emissão, espécies em um estado excitado podem emitir fótons de energias características retornando ao estado de energia mais baixos ou estados fundamentais. Parte da radiação que passa pela a matéria, em vez de ser absorvida, pode ser espalhada ou refletida ou pode ser reemitida no mesmo comprimento de onda ou em um comprimento de onda diferente ao emergir da amostra. A radiação, que não é absorvida nem espalhada, pode sofrer mudanças na orientação ou polarização à medida que passa pela amostra <sup>80</sup>. Na figura 7 é apresentado o diagrama do espectro eletromagnético, mostrando o tipo de comprimento de onda com exemplos, frequência e temperatura de emissão.

**Figura 7.** Diagrama do espectro eletromagnético, mostrando o tipo de comprimento de onda com exemplos, frequência e temperatura de emissão <sup>81</sup>.



**Fonte:** Domínio público. EM Spectrum Properties es.svg. Criadoeml: 17 de fevereiro de 2008. Disponível em: <<u>https://es.wikipedia.org/wiki/></u> Acesso em set. 2020 <sup>81</sup>.

Espectroscopia é o estudo das propriedades da matéria por meio de sua interação com vários tipos de radiação (principalmente radiações do espectro do eletromagnético).

Técnicas espectrométricas são um grande grupo de métodos analíticos baseados em espectroscopia atômica e molecular. Espectrometria e métodos espectrométricos referem-se à medição da intensidade de radiação com um transdutor fotoelétrico ou outro tipo de dispositivo eletrônico. A espectrometria UV-VIS é uma das técnicas instrumentais de análise mais antigas e é a base para uma série de métodos ideais para a determinação qualitativa e quantitativa de analitos em uma amostra. Diz respeito à medição da interação de radiações eletromagnéticas no ultravioleta (UV) e/ou região do visível com as espécies absorventes como átomos, moléculas ou íons.

Origem e características do espectro UV-visível:

O espectro UV-VIS resulta da interação da radiação eletromagnética na região UV-Visível com moléculas, íons ou complexos. É a base da análise de

diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas. Estas determinações encontram aplicações em pesquisa, indústria, laboratórios clínicos e na análise química de amostras ambientais <sup>80</sup>.

Nanopartículas de metal dentro de 100 nm de diâmetro espalham a luz óptica com muita eficiência devido à sua ressonância plasmônica de superfície. Esta é uma ressonância coletiva de os elétrons de condução no metal. A largura de banda do espectro, magnitude, e o pico de comprimento de onda da ressonância plasmônica ligada à nanopartícula depende da composição do material, meio, forma e tamanho do material. Por exemplo, as partículas de ouro apresentam uma forte banda de absorbância na região visível (500-600 nm)<sup>82</sup>.

### 2.9.2 Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH

A fluorescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado, no qual o retorno ao estado fundamental ocorre via emissão de um fóton. Este fenômeno normalmente ocorre em compostos orgânicos aromáticos. Algumas substâncias fluorescentes típicas (fluoróforos) emitem em um comprimento de onda particular na região do espectro visível, onde um feixe da emissão da fluorescência é detectado, gravado e traçado em função do comprimento de onda. Mesmo as substâncias não-fluorescentes podem ser estudadas desse modo usando uma marcação com fluoróforos <sup>83</sup>.

Fluorescência é uma metodologia usada extensivamente em biotecnologia, citometria de fluxo, diagnóstico médico, sequenciamento de DNA, forense e análise genética, para citar alguns. A detecção por fluorescência é altamente sensível e permite que despesas e dificuldades de manuseio de traçadores radioativos para a maioria das medições bioquímicas sejam minimizadas. A imagem de fluorescência pode revelar a localização e medições de moléculas intracelulares, às vezes no nível de detecção de uma única molécula. A tecnologia de fluorescência é usada por cientistas de muitas áreas <sup>83</sup>.

A espectroscopia de fluorescência usa um laser de excitação para excitar fluoróforos nas moléculas de uma amostra, o qual é emitido durante o abrandamento dentro de um período dos nanosegundos. É uma técnica extremamente sensível e pode detectar quantidades extremamente pequenas do analito. A espectroscopia da fluorescência é útil em muitas aplicações em diversos

campos, na qual se baseia na detecção e na determinação de compostos orgânicos. Em biociência, a técnica é utilizada para a quantificação de DNA e RNA; na indústria é utilizada em vários ambientes como uma técnica rápida e não invasiva de detecção de contaminantes; na química pode ser empregada no campo da síntese de nanopartículas para uso na medicina; no monitoramento ambiental, como por exemplo no monitoramento de águas residuais; na área farmacêutica como controle de qualidade para analisar medicamentos; na agricultura é utilizada para identificar diferentes variedades de culturas <sup>83</sup>.

# 2.9.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

## - Dynamic Light Scattering - DLS

A detecção de dispersão de luz é uma técnica útil com aplicações em inúmeras disciplinas onde, dependendo da fonte de luz e detector, propriedades específicas de moléculas podem ser estudadas. Em um experimento de espalhamento de luz típico, a amostra é exposta a uma onda de luz monocromática e um detector apropriado detecta o sinal. Um dos primeiros experimentos de dispersão de luz foi descrito por John Tyndall, que caracterizou a dispersão de luz de suspensões coloidais (Efeito Tyndall), onde as partículas são maiores do que o comprimento de onda da luz incidente (Tyndall 1868)<sup>84</sup>.

Considerações teóricas:

Quando um feixe de luz monocromático encontra a solução contendo macromoléculas, a luz se espalha em todas as direções em função do tamanho e da forma dessas partículas. No espalhamento de luz estático, a intensidade da luz espalhada é analisada como intensidade média do tempo, o que fornece informações sobre peso molecular e raio de giração de macromoléculas. Por outro lado, se as leituras de intensidade (causadas devido ao movimento browniano de macromoléculas em solução) de luz espalhada são analisadas, o coeficiente de difusão (DT) que está relacionado ao tamanho hidrodinâmico das macromoléculas pode ser obtido. Espalhamento de luz dinâmico, também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento de luz quase elástico, é uma técnica que mede principalmente o movimento browniano de macromoléculas em solução que surge devido ao choque de moléculas de solvente e relaciona esse movimento ao tamanho das partículas <sup>84</sup>.

O DLS tem se mostrado particularmente popular na determinação do comportamento hidrodinâmico de nanopartículas, proteínas, ácidos nucléicos e vírus devido à sua capacidade de fornecer informações sobre tamanho e agregação <sup>84</sup>. A taxa de difusão das nanopartículas afeta o tempo, com o qual a função diminui. Como a análise é baseada no movimento browniano, no qual as partículas grandes movem-se mais lentamente e dispersam mais luz do que as pequenas partículas. O diâmetro de uma esfera hipotética não porosa que pode se difundir na mesma velocidade que a das nanopartículas a serem caracterizadas é referido como o diâmetro hidrodinâmico, e o cálculo depende do tempo da medição da intensidade de espalhamento. Com isso também é possível obter detalhes sobre o estado de agregação das nanopartículas. Uma solução agregada terá tamanhos-diâmetros hidrodinâmicos maiores que o tamanho por microscopia eletrônica de transmissão (MET), enquanto a solução não agregada terá um diâmetro semelhante ao tamanho por MET. Os diâmetros hidrodinâmicos dependem do tamanho e forma das macromoléculas <sup>82</sup>.

## 2.9.4 Potencial Zeta

Quase todos os materiais ou particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. Essa carga pode aparecer de várias maneiras - a dissociação de grupos ionogênicos na superfície da partícula e a adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido <sup>85</sup>.

Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero <sup>85</sup>.

Em um campo elétrico, como em microeletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no

plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamada de potencial Zeta <sup>85</sup>.

Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. O potencial Zeta é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Quanto maior o potencial Zeta mais provável que a suspensão seja estável pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. A medida do potencial Zeta é usada com frequência como a chave para compreender processos de dispersão e agregação em aplicações tão diversas quanto purificação de água, moldes cerâmicos ou a formulação de tintas e cosméticos <sup>85</sup>.

Em termos de estabilidade coloidal, os sólidos têm energia livre mais baixa e são mais estáveis do que coloides; que existem em um estado metaestável - eles estão constantemente sob a influência de forças atrativas. As forças repulsivas evitam a sua agregação. Na maioria dos líquidos polares, essas forças são provenientes das cargas das partículas. As mudanças na energia livre podem provocar instabilidade do estado. O valor mais elevado implica na dispersão mais estável. Valores baixos podem indicar instabilidade coloidal que pode levar à agregação <sup>85</sup>.

Nanopartículas ou partículas coloidais terão uma carga superficial em suspensão. Assim, sob um campo elétrico, a medição óptica do movimento da partícula pode ser usado para determinar o potencial Zeta. A eletroforese refere-se ao movimento das nanopartículas sob um campo elétrico aplicado. As nanopartículas devem estar suspensas em um solvente de índice de refração conhecido. Assim o potencial Zeta será a medida da carga elétrica efetiva na superfície da nanopartícula e quantifica a estabilidade de carga das partículas coloidais <sup>82</sup>.

A magnitude do potencial Zeta fornece informações sobre a estabilidade das nanopartículas. A maior magnitude representa maior estabilidade devido ao aumento da repulsão eletrostática. As partículas com potencial Zeta nas faixas de: 0-5 mV tendem a se agregar; 5–20 mV são minimamente estáveis; 20–40 mV são moderadamente estáveis e com potencial Zeta com magnitude superior a 40 mV são altamente estáveis. Outro fator importante que pode influenciar a magnitude da

carga de superfície da nanopartícula é o pH da solução. Em um determinado pH, a carga superficial pode ser levada a zero, que é conhecido como o ponto isoelétrico <sup>82</sup>.

# 2.9.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As técnicas de microscopia eletrônica revolucionaram a tecnologia atual. Tanto a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) como as microscopias de força atômica (AFM) e de tunelamento são utilizadas no desenvolvimento da nanotecnologia na avaliação e manipulação da matéria em escala nano e atômica <sup>82,86</sup>. Neste trabalho apenas a microscopia de transmissão foi utilizada.

A caracterização estrutural e analítica em escala nanométrica passou a ser muito importante para todos os tipos de materiais nos últimos anos. O Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) é um instrumento para avaliar parâmetros como tamanho de partícula, tamanho de grão, tipo de rede, informações morfológicas, detalhes cristalográficos, composição química, tipo de fase e a distribuição. Os padrões de difração de elétrons de nanomateriais também são usados para adquirir informações quantitativas contendo tamanho, identificação de fase, relação de orientação e defeitos de cristal na estrutura da rede etc. <sup>82,86</sup>.

A formação de imagem no MET é uma projeção bidimensional da amostra, podendo haver sobreposição das linhas e áreas de interesse. A imagem final pode ser de campo claro ou campo escuro, sendo que cada modo de imagem fornece informações complementares sobre a amostra. No modo campo claro, uma abertura é acionada no plano focal inferior da lente objetiva que permite a passagem apenas dos feixes diretos, não difratados. As regiões correspondentes a estes feixes surgem escuras na imagem, enquanto regiões com nenhuma amostra no caminho do feixe aparecem mais claras na imagem. Na imagem de campo escuro, o feixe direto é bloqueado pela abertura do plano focal inferior enquanto um ou mais feixes difratados passam pela lente objetiva e aparecem claros na imagem. As regiões cujos feixes refratados não foram coletados vão aparecer escuras na imagem. Os feixes difratados interagem com a amostra, fornecendo importantes informações, como defeitos na estrutura e tamanho de partículas <sup>82,86</sup>.

A maioria dos MET utilizados em nanotecnologia dispõe de tensão de aceleração de até 300 kV. No entanto, para amostras biológicas em geral, operam na faixa de 60 a 80 kV <sup>82,86</sup>.

# 2.9.6 Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

A Espectroscopia de Emissão Óptica de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) é uma técnica que usa um plasma como fonte e depende da emissão óptica para análise. No entanto, ao contrário de muitos outros espectrômetros, a amostra não é simplesmente colocada entre a fonte e o detector. O ICP-OES é usado principalmente para amostras líquidas, que primeiro precisam ser transformadas em um aerossol ("nebulização") e, em seguida, são injetadas no plasma <sup>82</sup>. Quando a energia do plasma é fornecida a uma amostra de análise de fora, os elementos componentes (átomos) são excitados. Quando os átomos excitados retornam à posição de baixa energia, os raios de emissão (raios do espectro) são liberados e os que correspondem ao comprimento de onda do fóton são medidos. O tipo de elemento é determinado com base na posição dos raios de fótons, e o conteúdo de cada elemento é determinado com base na intensidade dos raios <sup>87</sup>.

Para gerar o plasma, primeiro o gás argônio é fornecido à bobina da tocha e uma corrente elétrica de alta frequência é aplicada à bobina de trabalho na ponta do tubo da tocha. Usando o campo eletromagnético criado no tubo da tocha pela corrente de alta frequência, o gás argônio é ionizado e o plasma é gerado. Este plasma possui alta densidade de elétrons e temperatura (10000 K) e esta energia é utilizada na excitação-emissão da amostra. As soluções das amostras são introduzidas no plasma em um estado atomizado através do canal estreito no centro do tubo da tocha <sup>87</sup>.

A espectroscopia ICP-OES tornou-se a tecnologia líder para a análise de rotina de amostras líquidas, bem como de materiais que podem ser facilmente transformados em uma forma líquida por dissolução ou digestão. O ICP-OES pode ser utilizado para quantificação de diversos elementos e consequentemente para diversas aplicações, tais como, calcular o rendimento de uma síntese, quantificar impurezas indesejáveis em um produto, rastrear metais e outros elementos em

solos e águas contaminadas etc. <sup>87</sup>. Neste trabalho a espectroscopia ICP-OES foi utilizada para verificar o rendimento e otimizar os métodos de síntese de AuNPs.

## 2.9.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS PAGE

A eletroforese em gel é uma técnica analítica comum que separa macromoléculas ou partículas com base em seu tamanho, forma e carga. É uma ferramenta poderosa para analisar nanopartículas de ouro e as modificações de superfície. A cor distinta das nanopartículas de ouro e de outras nanopartículas compostas por metais nobres permite a observação direta da amostra e suas migrações dentro do gel <sup>88</sup>.

A modificação da superfície do ouro com ligantes carregados ou moléculas com grupos químicos amina, carboxila, oligonucleotídeos ou proteínas geralmente resulta em uma mudança na carga da superfície, que pode ser vista por um padrão de migração alterado (direção ou distância de migração) em géis de agarose ou poliacrilamida utilizados em eletroforese. Além disso, o revestimento de superfície com biomoléculas, como proteínas, aumenta o tamanho das nanopartículas, diminuindo assim sua velocidade eletroforética quando comparada a nanopartículas de ouro não modificadas <sup>88</sup>.

A eletroforese em gel pode, assim, ser efetivamente usada na otimização das condições de conjugação de moléculas em nanopartículas de ouro, revelando o ponto de saturação além do qual o aumento da carga de moléculas não causa mais deslocamento de migração da banda. A eletroforese em gel de agarose também pode ser usada para separação seguida de isolamento e purificação de componentes individuais após a funcionalização <sup>88</sup>.

O termo SDS-PAGE significa eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS) poliacrilamida (PAGE) e é útil para análise de peso molecular de proteínas. SDS é um detergente que se dissocia e desdobra proteínas oligoméricas em suas subunidades. O SDS se liga aos polipeptídios para formar complexos com razão carga/massa bastante constante. A taxa de migração eletroforética através de um gel é, portanto, determinada apenas pelo tamanho dos complexos. Os pesos moleculares são determinados utilizando simultaneamente padrões de proteínas de peso molecular conhecido (*markers* ou *ladders*)<sup>88</sup>. Neste trabalho a eletroforese

foi utilizada como ensaio para compreender o tipo de ligação/interação entre as nanopartículas de ouro e o recobrimento proteico de albumina.

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais utilizados para a elaboração dessa tese estão descritos em detalhes no APÊNDICE A e os principais equipamentos utilizados estão descritos no APÊNDICE B.

## 3.1 Planejamento experimental

Organograma com o planejamento experimental está dividido em duas estas. A etapa I consiste no desenvolvimento de uma nova nanopartícula de ouro produzida com base nos conceitos de nanotecnologia verde funcionalizada com albumina do soro humano via radiação gama. A etapa II implica em ensaios para avaliar a toxicidade dessas partículas assim como seu potencial para aplicações biomédicas em nanomedicina. Na figura 8 é apresentado sucintamente o organograma do planejamento experimental deste estudo.



Figura 8. Organograma de planejamento experimental

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

## 3.2 Síntese das nanopartículas

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas por meio da adaptação da metodologia estabelecida por Katti e colaboradores <sup>52</sup>. O método de síntese se inicia com a dissolução de 1,6 mM de NaAuCl<sub>4</sub> em água ultrapura ou em solução tampão fosfato (10 mM), previamente aquecida a temperatura de 50 °C, seguida da adição do agente redutor EGCG na concentração de 0,8 mM sob agitação vigorosa (1500 rpm). Os átomos de Au<sup>3+</sup> são reduzidos em Au<sup>0</sup> em poucos segundos. A reação permaneceu sob agitação por mais 2 min, a formação das AuNPs é facilmente evidenciada pela mudança de coloração de amarela para vermelho em poucos instantes após a adição do agente redutor. Em seguida, a suspenção de AuNPs mistura é retirada do aquecimento e deixada sob agitação em temperatura por mais 2 horas.

Na figura 9 está representada a síntese de AuNPs.





Fonte: Adaptado de: FREITAS F.L.; VARCA, G.H.C.; BATISTA, J. G. S.; BENÉVOLO, L.A. (2020).<sup>1</sup>

Foram realizadas duas etapas de centrifugação para eliminar os produtos de oxidação e obter nanopartículas com menor variação de tamanho possível, ou seja, menor índice de polidispersão. A suspensão de nanopartículas resultante foi armazenada a 4°C

<sup>&</sup>lt;sup>I</sup> Patente depositada no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. Depósito: 11/02/2020. Consultar APÊNDICE C

O recobrimento com albumina foi realizado inicialmente utilizando albumina do soro bovino (ASB) e após padronização e otimização do método foi utilizada a albumina do soro humano (ASH). Foram testadas concentrações que variaram de 0,2 a 1% (m/v). Após a homogeneização, as nanopartículas foram submetidas a radiação gama na dose otimizada de 10 kGy e taxa de dose de 5 kGy.h<sup>-1</sup>. Na figura 10 está representada esquematicamente a funcionalização com o recobrimento proteico das EGCG-AuNPs via radiação ionizante.

**Figura 10.** Representação esquemática da funcionalização induzida por radiação gama (10 kGy) das EGCG-AuNPs com albumina do soro bovino (ASB) ou albumina do soro humano (ASH).



Fonte: Adaptado de: FREITAS F.L.; VARCA, G.H.C.; BATISTA, J. G. S.; BENÉVOLO, L.A. (2020)."

As especificações e parâmetros estão descritos pormenorizadamente na patente depositada.<sup>II</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>II</sup> Patente depositada no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. Depósito: 11/02/2020. Consultar APÊNDICE C

## 3.3 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro

#### 3.3.1 Espectrofotometria UV-Visível

As nanopartículas de ouro são conhecidas pela ressonância plasmônica de superfície, que é observada no espectro de extinção no UV-Visível característico de AuNPs com cerca de 15-40 nm, apresentando uma banda larga com absorção máxima entre 520-540 nm. Esse fenômeno também é responsável pela coloração das suspenções coloidais de AuNPs, que varia de acordo com o tamanho e as diferentes formas geométricas. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro modelo Spectramax i3 (Molecular Devices, USA).

A espectrofotometria UV-Visível foi utilizada como técnica fundamental para a verificação da formação das AuNPs e para acompanhar a estabilidade da suspenção coloidal, otimização e reprodutibilidade do método de síntese.

## 3.3.2 Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH

A técnica espectrofotométrica por fluorescência foi utilizada para verificar como os resíduos de aminoácidos se comportam quando a albumina está adsorvida na nanopartícula de ouro antes e após irradiação gama (γ). Os espectros de fluorescência foram obtidos em espectrofotômetro modelo Spectramax i3 (Molecular Devices, USA). Foram verificados os sinais de fluorescência nos principais resíduos considerados fluoróforos triptofano (excitação em 295 nm e emissão de 320 a 500 nm), fenilalanina (excitação em 260 nm e emissão de 285 a 500 nm) e tirosina (excitação em 272 nm e emissão de 297 a 500 nm) quando a albumina está adsorvida na nanopartícula de ouro antes e após a irradiação. Também foi observado por fluorescência a formação de bitirosina (excitação em 325 nm e emissão de 350 a 600 nm) nas amostras irradiadas.

As microplacas utilizadas para o ensaio baseado em fluorescência foram microplacas de 96 poços com paredes e fundo preto que minimizam a diafonia e a autofluorescência poço a poço e, portanto, são otimizadas para aplicações baseadas em fluorescência.

# 3.3.3 Rendimento da Síntese por Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)

Para determinar o rendimento no processo de síntese das AuNPs foi utilizado o método de determinação de ouro (Au) por Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES).

Foi utilizado o equipamento espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio (ICP OES), marca Spectro, modelo Arcos (Spectro Analytical Instruments Co, Kleve, Alemanha).

A determinação das concentrações de ouro foi realizada com base na curva de calibração preparada a partir de diluições da solução padrão certificada de Au (1000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, Inorganic Ventures, USA), em meio de solução de HNO<sub>3</sub> 1 % (v/v) preparada com água tipo I (18,25 cm M $\Omega$ , Biosafer). Essas soluções foram preparadas em base massa utilizando balança analítica calibrada.

As determinações foram realizadas utilizando a linha espectral de 242,795 nm, nas amostras previamente preparadas e entregues no Laboratório de Análises Química e Ambiental (LAQA) localizado no Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA-IPEN). O LAQA possui sistema de gestão da qualidade implantado com base na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017.

# 3.3.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

O tamanho das partículas foi obtido usando o espalhamento dinâmico de luz (DLS) medido pelo Zetasizer Nano-ZS Instrument (Malvern Panalytical). O ângulo de detecção foi de 173°. 1 mL de suspensões de nanopartículas de ouro foi colocado em cubetas adequadas para a técnica de espalhamento de luz e medidas a 25°C. O sistema automatizado de caracterização de partículas do software Zetasizer, versão 7.12, foi o software utilizado para obter e analisar os dados de tamanho das nanopartículas de ouro. No DLS a intensidade do espalhamento da luz é proporcional ao tamanho da partícula.

A estabilidade das nanopartículas foi inferida indiretamente pelo Potencial Zeta. A medida da magnitude da repulsão ou de atração eletrostática ou das cargas entre partículas é um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade, o outro é o impedimento estérico.

Foi verificada a estabilidade das AuNPs em relação ao pH e concentração de NaCl. Foi observado por DLS a variação de tamanho da nanopartícula EGCG-AuNPs frente as mudanças de pH e a adição de NaCl. Para tanto, o equipamento de DLS foi acoplado a um módulo de titulação automática com pHmetro.

No caso da titulação ácido-base, a amostra EGCG-AuNPs foi submetida a pH 11 com adição de NaOH 0,1 M e depois acidificada com pequenas adições de HCI 0,1 M até pH 3, a cada variação de aproximadamente 0,5 no valor de pH foi feita uma medida de tamanho por DLS.

Na avaliação frente à adição de NaCl, foi realizada uma medida de tamanho das EGCG-AuNPs por DLS a cada 0,5% de NaCl adicionado, até a concentração final de 7,5% de NaCl.

Para determinar a concentração adequada de albumina, foi realizada a avaliação de tamanho e estabilidade, utilizando as técnicas DLS e Potencial Zeta respectivamente. A adição de ASH foi realizada utilizando o mesmo aparato de titulação automática descrito anteriormente.

### 3.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram adquiridas usando uma câmera OneView 4K (Gatan) com uma faixa de desfocagem de -1 a -2 µm em temperatura ambiente em um microscópio JEOL JEM 1400Plus operado a 120 kV. As amostras foram preparadas em grades de cobre de malha 400 descarregadas pelo brilho (15 mA, carga negativa por 25 s) cobertas por uma fina camada de filme contínuo de carbono (Ted Pella, Inc., EUA). Após 1 minuto, o excesso de amostra foi secado com papel de filtro e a grade foi lavada três vezes com água deionizada. Nos casos das amostras contendo proteína foi feita uma etapa adicional após a lavagem na qual adicionou-se acetato de uranila para melhorar o contraste e diminuir a desnaturação das moléculas orgânicas.

O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado por meio das ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup>, o mesmo utilizado para aquisição das imagens. Antes de obter as medidas das nanopartículas, as ferramentas do software são calibradas de acordo com a magnificação da imagem.

Para a obtenção da média foram feitas as medições em 400 nanopartículas para cada amostra, utilizando critérios pré-definidos.

Foram estabelecidos os seguintes critérios:

- De cada nanopartícula de ouro foram obtidas as médias de 3 medidas para o core (uma medida com ferramenta de circunferência e duas medidas com a ferramenta de secção levando em consideração as maiores dimensões da nanoestrutura);
- Para AuNPs contendo recobrimento proteico de albumina foram obtidas as médias de 3 medidas para o *core* e mais 3 medidas para o recobrimento proteico utilizando as ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup>;
- Não foram consideradas para a contagem as AuNPs:
  - Sobrepostas
  - Minimamente encostadas;
  - Tangenciando a borda da imagem;
  - Enquadradas parcialmente (cortadas pela borda da imagem).

# 3.3.6 Eletroforese: SDS-PAGE

Alíquotas das amostras de nanopartículas de ouro EGCG-AuNPs, EGCG-AuNPs-ASH, EGCG-AuNPs-ASHy, albumina do soro humano (ASH) e albumina do soro humano irradiada a 10 kGy (ASHy) foram diluídos em tampão de amostra contento β-mercaptoetanol e dodecilsulfato de sódio como agente desnaturante, e azul de bromofenol e glicerina. O tampão de corrida e o tampão de empilhamento foram feitos com Tris (aminoetano). O persulfato de amônio foi utilizado para a polimerização do gel de poliacrilamida (bis-acrilamida e acrilamida) e a tetrametiletilenodiamina (TMED) para acelerar a reação de polimerização. Para o gel de corrida foi utilizado 12% de poliacrilamida e o gel de empilhamento 4%, utilizando marcador de proteína de amplo espectro de massa ("high range": 10-260 kDa). Durante a corrida, a cuba foi submetida a 180 V (aproximadamente 100 mA), nesta etapa não existe um tempo pré-definido, a migração das amostras depende de suas características, assim foi realizada a observação até o momento em que as amostras terminem a migração sem que atravessem totalmente o gel. O tempo de corrida deve ser suficiente para que a migração do marcador padrão utilizado termine. Após a corrida e retirada da cuba, o gel foi colocado em placa de petri e corado por 12 horas em solução corante de *coomassie blue* sob agitação em agitador tipo *shaker* a 40 RPM. Após a coração o gel foi descorado e em solução descorante de ácido acético e metanol. A eletroforese foi realizada em um *PowerPac* mini vertical (Bio-Rad, USA).

Neste caso, o uso da radiação ionizante como agente de reticulação fornece energia suficiente para ionização das moléculas de proteína, estes grupos se tornam potencialmente capazes de se ligar a superfície das nanopartículas por meio de interações e ligações químicas, levando ao aumento de estabilidade das AuNPs. Assim, a motivação para a utilização da técnica de eletroforese, se dá pela possibilidade de inferir e melhor compreender os tipos de interação entre as moléculas proteicas e as nanoestruturas, pois nanopartículas metálicas não são passíveis de migração no gel, devido a estrutura cristalina rígida que não permite a movimentação.

## 3.4 Avaliação da Citotoxicidade

#### 3.4.1 Citotoxicidade in vitro

Foram realizados dois métodos diferentes para a avaliação da citotoxicidade. No primeiro, foram testados o agente redutor e as nanopartículas de ouro contendo albumina bovina e humana em linhagem de fibroblastos de tecido conectivo de camundongo como uma etapa preliminar na avaliação da citotoxicidade. No segundo ensaio, foram testados apenas as AuNPs em linhagem de fibroblastos de pulmão murino e linhagens de células de tumores de mama e próstata humano.

1° Foi realizado o ensaio de citotoxicidade *in vitro* para determinar a metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub> - concentração de extrato que induz 50% de lise ou morte celular) de EGCG, EGCG-AuNPs, EGCG-AuNPs-ASB, EGCG-AuNPs-ASH, seguindo a Norma Internacional ISO 10993-5 (2009) <sup>89</sup>. Este ensaio foi realizado pelo método de absorção de vermelho neutro. As soluções diluídas das amostras (3,12%; 6,25%; 12,5%; 25% e 50%) foram colocadas em contato com as células do tecido conjuntivo de camundongo, linhagem NCTC-L929 (CCIAL 020), cultivadas em microplacas de 96 poços. As microplacas foram fornecidas pelo Núcleo de Culturas de Células do Instituto Adolfo Lutz com as células já aderidas e

prontas para o ensaio de citotoxicidade. No ensaio, além do controle celular foram utilizados um controle negativo: polietileno de alta densidade (PEAD) 0,1 g.mL<sup>-1</sup> e controle positivo: látex de borracha natural na proporção de 0,1 g.mL<sup>-1</sup>, ambos em meio de cultura celular (meio mínimo de Eagle). A viabilidade celular foi verificada pela incorporação de vermelho neutro pelas células vivas e intactas. A leitura da densidade óptica da solução final de microplaca foi realizada em um espectrofotômetro, leitor ELISA-SUNRISE, a 540 nm, após lise celular. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação às células controle e projetada em um gráfico em função da concentração para obtenção de uma curva que indicava o IC<sub>50</sub>.

**2°** Nesse ensaio foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: V79-4 (células de tecido pulmonar de hamster chinês macho); MDA-MB 231 (carcinoma de mama) e PC3 (câncer de próstata humano). Avaliação dos efeitos citotóxicos foi realizada pelo método colorimétrico do MTS. Em triplicata por concentração, as células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após adesão, as células foram tratadas com as amostras de AuNPs diluídas em meio de cultura DMEM 1:1 (v/v) e incubadas em estufa úmida a 37 °C, com tensão de CO<sub>2</sub> (5%) por 24 horas. Foram utilizados meio de cultura DMEM e DMSO como controles negativo e positivo respectivamente. Em seguida, foram adicionados 20  $\mu$ L de MTS em cada poço e as placas incubadas em estufa por 3 horas. O cálculo de viabilidade celular foi realizado considerando as densidades ópticas obtidas com o leitor de microplacas em espectrofotômetro modelo Spectramax i3 (Molecular Devices, USA) em comprimento de onda de 490 nm.

# 3.4.2 Citotoxicidade in vivo: peixe zebra

### Manutenção e acasalamento dos peixes:

O peixe-zebra adulto (*Danio rerio*) foi mantido no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB (São Paulo, Brasil) e na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB são alocados em aquários plásticos contendo água da torneira descorada, pH entre 7 e 8, temperatura de 25 ± 2°C em fotoperíodo

de 14 horas de luz/10 horas de escuro. Eles são alimentados três vezes ao dia com comida de peixe disponível comercialmente e Artêmia.

O peixe-zebra selvagem da linha AB foi criado em Tecniplast Zebtec (Buguggiate, Itália) em sistemas de alojamento de peixe-zebra na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os peixes utilizados para os experimentos foram obtidos de cruzamentos naturais e criados de acordo com métodos padrão. Os peixes-zebra foram mantidos em grupos de 10 peixes por tanque de 3,5 L e alimentados três vezes ao dia com Gemma micro por Skretting (Stavanger, Noruega). O fotoperíodo (14 horas de luz / 10 horas de ciclo escuro) e os parâmetros de qualidade da água (temperatura de 28 ± 1°C; pH = 7,3 ± 0,2; condutividade de 500 a 800  $\mu$ S) foram mantidos estáveis durante todo o experimento.

Em relação ao acasalamento, no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB, organismos com idade entre 4-5 meses já são capazes de se reproduzir. No final do dia, os casais foram selecionados e mantidos separados em aquários reprodutores na proporção de 1:2 ou 1:1 entre machos e fêmeas. Os aquários foram mantidos arejados e no escuro até a manhã do dia seguinte. No dia seguinte, os casais foram agrupados, ainda no escuro e submetidos ao estímulo luminoso com a ligação do fotoperíodo. Após esse período, se iniciou o ritual de acasalamento e liberação de ovos. Os casais foram mantidos em reprodução por até 1,5 hora. Os embriões fertilizados são coletados e colocados em placas de Petri (máximo de 50 embriões por placa) com meio embrionário (solução 50 X concentrada: 14,69 g de NaCl, 0,63 g de KCl, 2,43 g de CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O e 4,07 g de MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O em 1 L de água de osmose reversa).

Na FMUSP, uma semana após o acasalamento, machos e fêmeas foram mantidos separadamente. Para garantir a desova sincronizada, peixes adultos (3 fêmeas e 3 machos) foram transferidos para gaiolas de desova plásticas (tanque de reprodução de 1,7 L da Tecniplast, Itália), com água do sistema de recirculação, no final do período diurno. Na manhã seguinte, após o comportamento natural de desova, os animais adultos foram devolvidos ao seu tanque original. Os embriões fertilizados foram coletados e colocados em placas de Petri (máximo de 50 embriões por placa) com meio embrionário.

Os ovos fertilizados que se desenvolveram normalmente no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB foram utilizados no teste de toxicidade aguda

(*Fish Embryo Test* - FET). Ovos fertilizados que se desenvolveram normalmente na FMUSP foram utilizados no ensaio de micro injeção. Para experimentos válidos, os ovos foram obtidos apenas a partir de reprodutores com uma taxa de fertilização superior a 70%, de acordo com as diretrizes da OECD para ensaios de ovos de peixes com embriões de peixe-zebra <sup>90,91</sup>.

# • Teste de toxicidade para embriões de peixes:

Neste ensaio foi realizada uma adaptação da norma, utilizando microplacas invés de placas de Petri, devido ao custo elevado da produção de grandes volumes de AuNPs. No teste de toxicidade para embriões de peixes, 40 ovos por tratamento foram utilizados e distribuídos em microplacas de 96 poços. Os ovos foram colocados em cada poço individualmente com 200 µL de solução de teste. Os tratamentos utilizados foram: controle negativo (meio embrionário), controle positivo (4 mg.L<sup>-1</sup> de 3,4-dicloroanilina), EGCG-AuNPs e seu respectivo agente redutor foram testados nas concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%. As microplacas foram mantidas em incubadora, na faixa de temperatura de 26 ± 1°C e ciclo de fotoperíodo de 14 horas claro / 10 horas escuro, durante 96 horas <sup>90,92</sup>.

Os ensaios foram realizados em duplicata (n = 2). Os organismos foram observados a cada 24 horas pelo microscópio invertido Olympus CK40. Na fase embrionária foram observados os seguintes parâmetros: coagulação de óvulos fertilizados, batimentos cardíacos, formação de somitos, descolamento do botão de cauda do saco vitelino, eclosão e letalidade. Após a eclosão, o parâmetro avaliado nas larvas foi a letalidade 90,91.

## • Ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion:

A metodologia para retirar os embriões dos córions foi baseada no protocolo descrito em Westerfield (2007), onde foi utilizada uma solução de Pronase na concentração de 1 mg/ml para remover o invólucro que protege o embrião. Neste ensaio foram utilizados embriões com 24 hpf (horas pós fecundação) sem o córion e expostos a amostras NPs em diluições seriadas e os controles positivo e negativo <sup>92,93</sup>.

Os grupos de embriões foram divididos em placas de 96 poços contendo 200 µl de solução por poço. Foi utilizado uma placa por concentração, sendo 1 embrião por poço <sup>88</sup>.

### Microinjeção em embriões de peixe-zebra:

O teste de microinjeção em embriões de peixe-zebra foi realizado de maneira a complementar a avaliação do nível de toxicidade das AuNPs *in vivo*. Os ensaios de microinjeção avaliaram as AuNPs e o agente redutor EGCG em embriões de Zebrafish. A microinjeção tem sido utilizada em biologia experimental com base na administração direta de substâncias nas células para investigar seu modo de ação ou potencial tóxico <sup>94</sup>.

A diferença entre a ensaio de microinjeção e o FET Test, é que as substâncias podem ser administradas diretamente no embrião, e a barreira natural, o córion, a membrana acelular que circunda o embrião até o momento de sua eclosão, pode não ser um fator que impeça a avaliação do nível de toxicidade de nanopartículas <sup>95</sup>. As agulhas de injeção foram confeccionadas com um capilar de vidro (vidro borossilicato, instrumento Sutter, EUA) e foram preenchidas com 10 µL de amostra por um Microloader (Eppendorf, EUA). A agulha foi colocada no suporte conectado a uma bomba de microinjeção pneumática (Harvard Apparatus, EUA). As injeções foram realizadas com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon SMZ1000), aumento de 80x.

De modo a acomodar os embriões durante a microinjeção, uma solução de agarose a 3% foi inserida em uma placa de Petri (90 x 15), com um molde (Z-Molds, WPI, EUA), imobilizando e mantendo os ovos úmidos. Os embriões foram coletados após 30 minutos da desova e acondicionados na placa de Petri com água de cultivo. As amostras foram injetadas diretamente no saco vitelínico dos embriões de Zebrafish com apenas um estágio celular. No total, foram utilizados 40 embriões por tratamento. Os tratamentos utilizados neste ensaio foram: controle W (água autoclavada); controle I (orifício causado pela microinjeção); EGCG e EGCG-AuNPs. O volume das amostras injetadas foi de 5 nL e os ensaios foram realizados em quadruplicada (n=4).

Após a microinjeção, foi realizada a transferência dos embriões para uma microplaca de 24 poços, na qual, cada poço continha 2 mL de água de cultivo e receberam 5 embriões. As placas foram mantidas a 28 ± 1°C em incubadora. Após

2 horas, os ovos coagulados e / ou sem fertilização foram descartados. Os embriões foram verificados quanto a coagulação, batimentos cardíacos e malformação a cada 24 horas. O ensaio foi encerrado após 96 horas.

#### Avaliação de dados FET: Peixe Zebra:

Com a porcentagem de letalidade dos organismos, a estimativa das concentrações que tiveram efeito em 50% dos organismos expostos foi calculada usando o método estatístico não paramétrico Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et al. 1977) <sup>96</sup>. As taxas de eclosão observadas nos organismos durante o teste foram avaliadas pelo teste t de student, para verificar se as amostras apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos organismos em comparação ao controle, com nível de significância de p <0,05.

Avaliação de microinjeção em embriões de peixe-zebra foi realizada por análise estatística no software Origin 9. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

# 3.5 Estudo in vitro da internalização Celular das EGCG-AuNPs: CytoVIVA

Para a realização dos estudos *in vitro* de internalização celular de EGCG-AuNPs, as linhagens celulares foram cultivadas em placas de seis poços, em cada poço foi colocada uma lamínula de microscopia antes do plaqueamento das células, para que as culturas celulares crescessem em cima das lamínulas. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, tensão de CO<sub>2</sub> 5%, tempo necessário para as células atingirem a confluência, que varia de acordo com a linhagem celular. Após esse período as células foram expostas às amostras de EGCG-AuNPs na proporção de 1:1 (v/v) nanopartículas e meio DMEM. Em seguida, incubadas nas mesmas condições descritas acima durante 2 horas.

Após a incubação na presença das nanopartículas, o meio foi removido, e as placas foram lavadas com PBS. Em seguida, foram retiradas as lamínulas de cada poço, as células foram fixadas com formaldeído 4% e após a secagem em temperatura ambiente, as lamínulas foram vertidas em lâminas de microscopia e devidamente seladas com esmalte para evitar secagem excessiva e/ou descolamento das células aderidas, levando a lise ou danos às estruturas celulares.

Neste estudo foram obtidas imagens por microscopia hiperespectral (microscópio modelo CytoVIVA) da linhagem celular MDA-MB 231, como mostrado nos resultados adiante.

#### 3.6 Radiomarcação das Nanopartículas de Ouro

Foram realizados dois ensaios utilizando os métodos de radiomarcação direta e indireta com o radionuclídeo <sup>99m</sup>Tc. As nanopartículas radiomarcadas foram EGCG-AuNPs (I) e EGCG-AuNPs-ASH<sub>Y</sub> (II).

#### 3.6.1 Radiomarcação direta

No método de radiomarcação direta, 100 µL de cada amostra das nanopartículas de ouro, EGCG-AuNPs (I) e EGCG-AuNPs-ASHy (II) foram adicionados a 1 mL de solução de Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> com atividade de 7,83 mCi (I) e 7,66 mCi (II), respectivamente. A duração da reação foi de 10 minutos, em temperatura ambiente (25°C). Para manter o <sup>99m</sup>Tc em estado de oxidação mais favorável para a incorporação do metal, foi adicionado cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>).

Para verificar a pureza radioquímica do ensaio de radiomarcação direta foi realizada a cromatografia de camada delgada (CCD). Foram feitas três corridas de cromatografia de camada delgada para cada amostra. Na primeira, usou-se tiras de ITLC, na segunda papel Whatman-3 e o solvente foi metanol/acetato de amônio (1:1), na terceira usou-se tiras de ITLC e solução salina.

## 3.6.2 Radiomarcação indireta

Na radiomarcação indireta, o radionuclídeo <sup>99m</sup>Tc foi complexado ao ligante tricarbonil formando o complexo <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> e posteriormente adicionado às amostras.

A duração da reação foi de 1 hora. Foram testadas duas proporções de solução de radionuclídeo atividade/amostra (4:1 e 2:1) para ambas as amostras.

Para a verificação da pureza radioquímica no método de radiomarcação indireta também foi realizada a CCD e cromatografia líquida de alta performance CLAE para verificar a pureza do complexo <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>. As fases estacionárias para

a CCD foram tiras de papel Whatman-1 utilizando metanol como fase móvel e duas tiras de TLC-AI para cada amostra, usando os solventes metanol e butanol para cada uma delas.

# 4.1 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Ouro

# 4.1.1 Espectrofotometria UV-Visível

O gráfico dos espectros de extinção das AuNPs sintetizadas nesse estudo e da ASH está apresentado na figura 11. O espectro de extinção no UV-Visível é característico da formação de AuNPs no qual há uma banda de absorção máxima entre 525-540 nm.

**Figura 11.** Espectros de extinção óptica das AuNPs e ASH obtidos em espectrofotômetro na faixa de 230 e 900 nm.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Existem duas maneiras de preparar conjugados de ouro, ou seja, absorção passiva e acoplamento covalente através de um ligante. Embora seja um processo de preparação relativamente simples, a absorção passiva de proteínas em nanopartículas de ouro não fornece uma fixação permanente do revestimento porque as moléculas podem dessorver da superfície ao longo do tempo. Além disso, em alguns casos, as proteínas perdem suas propriedades após serem absorvidas para a superfície, o que pode ser causado por interações na estrutura terciária ou ligação do sítio ativo/sítio de ligação do antígeno à superfície do ouro tornando-a inacessível <sup>97</sup>.

Neste trabalho, para evitar a perda de grupos funcionais, ao invés de utilizar ligantes químicos, geralmente tóxicos, foi utilizada a radiação gama. A radiação gama possui energia suficiente para ionizar as moléculas, e assim formar ligações fortes na superfície das nanopartículas de ouro. Dessa maneira, se evita o uso de ligantes químicos, aumenta a probabilidade de grupos funcionais e sítios de ligação permanecerem ativos, e não tem a desvantagem de proteínas do revestimento das nanopartículas dessorver da superfície ao longo do tempo <sup>14,78</sup>.

Na figura 11 não foi apresentado o espectro da albumina do soro bovino (ASB) pois as diferenças no espectro das albuminas humana e bovina ocorrem na faixa do UV, ou seja, no caso das proteínas utilizadas, em comprimentos de onda inferiores a 320 nm. Portanto, não havendo diferenças nos comprimentos de onda do espectro visível <sup>98</sup>.

Em uma pesquisa realizada por Flores *et al.* (2017) foram estudadas as concentrações de proteína na preparação de AuNPs e a influência de albuminas de diferentes fontes. Considerando a quantidade de proteína adicionada à suspensão AuNPs, nenhuma mudança de pico foi encontrada na faixa de 5 a 30 mg.mL<sup>-1</sup> de concentração de proteína <sup>99</sup>. Esses resultados corroboram com o espectro apresentado na figura 11, onde nenhuma alteração na interação AuNP/proteína foi encontrada de acordo com as concentrações de 0,2 a 1% (m/v) de albumina utilizadas.

#### 4.1.2 Fluorescência – EGCG-AuNPs contendo ASB e ASH

Na figura 12 estão apresentados os espectros de fluorescência das AuNPs contendo albumina do soro bovino (ASB) e albumina do soro humano (ASH), tanto não irradiadas quanto irradiadas a 10 kGy em irradiador gama com fonte de <sup>60</sup>Co (Cobalto-60). Nessa avaliação foram observados os resíduos de triptofano, fenilalanina, tirosina e a formação de bitirosina. As medidas de intensidade de fluorescência foram normalizadas a partir dos valores obtidos para albumina nativa.

Por meio da observação dos gráficos de fluorescência das AuNPs recobertas com proteína, foi possível verificar a ausência de sinal nos principais resíduos considerados fluoróforos (triptofano, fenilalanina e tirosina) quando a albumina está adsorvida na nanopartícula de ouro. A albumina irradiada a 10 kGy apresentou diminuição significativa nos sinais de fluorescência dos resíduos de aminoácidos quando comparado com a proteína não irradiada. De acordo com os dados de fluorescência apresentados por Jokar *et al.* (2014), a dose de 2 kGy de radiação ionizante é capaz de destruir a proteína, ou pelo menos o ambiente local ao redor dos resíduos de aminoácidos do triptofano, normalmente 1 kGy é suficiente para causar a quebra da cadeia polipeptídica de albumina <sup>98</sup>.

A principal evidência de formação de ligações covalentes entre as albuminas quando submetidas a irradiação gama é a formação de bitirosina. Na figura 13 está representada a estrutura química da bitirosina. No gráfico (d) da figura 12, foi observado um aumento significativo do sinal de fluorescência da bitirosina. É esperado que a formação de bitirosina contribua com aumento da estabilidade do recobrimento da nanopartícula <sup>100,101</sup>.

Em 1978, pesquisadores relataram o aparecimento dessa estrutura com a catarata senil. Apesar de não ter relação com o presente estudo, os dados de fluorescência (emissão em 320/ excitação em 405) da bitirosina corroboraram para identificação dessa ligação nas estruturas das EGCG-AuNPs-ASH após a irradiação, sugerindo a formação de ligações covalentes (*crosslink*) entre as moléculas de proteína, contribuído assim para maior estabilidade das NPs <sup>100, 101</sup>.

**Figura 12.** Espectros de fluorescência dos resíduos dos aminoácidos triptofano(a), fenilalanina(b), tirosina(c) e a formação de bitirosina(d) das amostras EGCG-AuNPs-ASB, EGCG-AuNPs-ASB, EGCG-AuNPs-ASB, EGCG-AuNPs-ASH, utilizando a ASB e ASB, como padrão de comparação.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Figura 13. Estrutura química da molécula de bitirosina.



Fonte: GARCIA-CASTINEIRAS, S.; DILLON, J.; SPECTOR, A. (1978) <sup>100</sup>.

Foi realizado um estudo da fluorescência no qual foram verificados os espectros de excitação e emissão dos resíduos fluoróforos da ASH antes e após o processo de irradiação, fixando a concentração de EGCG-AuNPs, a dose de radiação em 10 kGy e a taxa de dose de 5 kGy.h<sup>-1</sup> e variando a concentração de ASH (1%, 0,5% e 0,1% m/v). Os fluoróforos analisados foram: bitirosina, tirosina, triptofano e fenilalanina.

Na figura 14 estão apresentados os espectros de fluorescência de emissão e excitação da bitirosina e tirosina e na figura 15 os espectros do triptofano e da fenilalanina.

**Figura 14.** Espectros de fluorescência de emissão e excitação da bitirosina e tirosina das amostras ASH e EGCG-AuNPs-ASH antes e após a irradiação na dose de 10 kGy e a taxa de dose de 5 kGy.h<sup>-1</sup>.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Com base nos espectros de fluorescência das AuNPs recobertas com ASH (figuras 14 e 15), foi possível verificar a diminuição ou ausência de sinal nos principais resíduos considerados fluoróforos (triptofano, fenilalanina e tirosina) quando a albumina está adsorvida na nanopartícula de ouro. A albumina irradiada a 10 kGy apresentou diminuição significativa nos sinais de fluorescência dos

resíduos de aminoácidos quando comparado com a proteína não irradiada. Como evidenciado por Jokar *et al.* (2014), a dose de radiação ionizante foi capaz de destruir os resíduos dos aminoácidos fluoróforos da albumina, levando à diminuição do sinal observada nos espectros de fluorescência <sup>98</sup>. A degradação causada pela radiação ionizante pode interferir na aplicação final das nanopartículas. Pois os sítios de ligação das moléculas podem estar ausentes ou diminuídos. Para aplicações complexas como entrega controlada de fármacos em alvos moleculares específicos, tais como receptores celulares, se faz necessário testar a capacidade de ligação das nanoestruturas em questão, inclusive a capacidade de carreamento da proteína me relação a estrutura proteica nativa.

**Figura 15.** Espectros de fluorescência de emissão e excitação da bitirosina e tirosina das amostras ASH e EGCG-AuNPs-ASH antes e após a irradiação na dose de 10 kGy e a taxa de dose de 5 kGy.h-1.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Não foi possível obter o início do espectro de emissão do triptofano devido a limitação do que equipamento, no qual o limite inferior do espectrofotômetro é de 230 nm.

# 4.1.3 Rendimento da Síntese por Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)

Os valores obtidos neste ensaio estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Valores obtidos por ICP OES da concentração e % de Au nas soluções durantes as etapas de síntese.

Amostras	[Au] µg.mL <sup>-1</sup>	%
[Au] Inicial	146,7	100,00
1º sobrenadante	76,7	52,28
2º sobrenadante	21,6	14,72
EGCG-AuNPs	47,6	32,45

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

A concentração inicial de Au no momento da síntese foi de 146 μg.mL<sup>-1</sup>. A concentração final de Au após todas as etapas da síntese foi de 47,6 μg.mL<sup>-1</sup>, no qual o rendimento médio calculado foi de 32,45%, considerando que 99,45% do Au<sup>3+</sup> foi reduzido formando EGCG-AuNPs. A perda calculada foi de 67,01%, devido às etapas de purificação por centrifugação, e a perda residual foi de 0,55%.

Nesse aspecto, o rendimento na síntese de AuNPs pelo método padronizado, no qual as nanopartículas foram duplamente centrifugadas, levou a um rendimento relativamente baixo. No entanto, as AuNPs residuais podem ser utilizadas em outras aplicações que não exijam um sistema monodisperso, por exemplo, na área cosmética e em dispositivos eletrônicos como sensores para aplicações biomédicas.
#### 4.1.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Na figura 16 estão representados os gráficos com variação de tamanho por DLS e de Potencial Zeta das AuNPs em relação à concentração de albumina ASH.

Com base nos resultados foi determinada a faixa de concentração adequada de ASH para a síntese das EGCG-AuNPs-ASHy, que foi de 0,2 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Também foi observada diminuição dos valores de Potencial Zeta de - 41 mV para -31 mV, não ocorrendo perda significativa de estabilidade por repulsão eletrostática. Ainda foi observado o ponto de equilíbrio entre adsorção de ASH e aumento de tamanho das AuNPs. Após a adição de 1,4 mg/mL de ASH as AuNPs apresentaram aumento máximo de tamanho por DLS, aproximadamente 100 nm.

**Figura 16**. Curva de variação de tamanho por DLS (vermelho) e do Potencial Zeta (azul) das AuNPs em relação ao aumento da concentração de ASH.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Na tabela 2 estão apresentados os valores obtidos pela técnica de DLS e Potencial Zeta das nanopartículas EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASH-<sub>y</sub>.

**Tabela 2.** Valores obtidos por DLS e Potencial-Z das EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASH-y.

<b>A</b>		Tamanho ø (			Potencial	
Amostras	Intensidade	Volume	Número	Z-Average	IPa	Zeta (mV)
EGCG- AuNPs	20,00 ± 5,79	15,83 ± 4,64	13,37 ± 3,29	18,12	0,097	- 41,2 ± 6
EGCG- AuNPs- ASHy	28,26 ± 8,87	21,46 ± 6,60	17,90 ± 4,51	25,33	0,108	- 36,9 ± 4

# ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Os dados apresentados na tabela 2 demonstram que o método de síntese estababelecido neste trabalho foi eficiente na obtenção de AuNPs com estreita faixa de tamanho. Esta característica está relacionada ao baixo índice de polidispersão (IPd) obtido para ambas nanopartículas, sendo 0,097 e 0,108 para EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASHy respectivamente. Este dado também evidencia que não há, mesmo que em pequenas quantidades, nanopartículas com tamanho hidrodinâmico superior a 35 nm, representado pelo valor obtido por intensidade. Pois um número pequeno de nanopartículas grandes em suspensão pode espalhar luz com uma intensidade muito elevada, mesmo que a concentração de pequenas nanopartículas em suspensão seja predominante em relação as partículas maiores.

Na figura 17 são mostrados os gráficos de distribuição de tamanho obtidos por DLS. Nesses gráficos são comparadas as amostras de EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASH-y em relação a intensidade, volume e número. É evidente o deslocamento no sentido de aumento de tamanho das nanopartículas nas amostras recobertas com albumina em relação às nanopartículas sem adição de proteínas nas 3 formas de medidas obtidas.

**Figura 17.** Distribuição de tamanho obtidos por DLS. Comparação entre as amostras de EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASHy em relação a intensidade, volume e número.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

As medidas de tamanho de partícula por DLS podem ser obtidas nas formas de intensidade, volume ou número de nanopartículas. Para a possível aplicação a qual as AuNPs estão sendo desenvolvidas nesse trabalho, o tamanho de interesse varia entre 10 e 45 nm. Partículas menores que 10 nm são mais facilmente excretadas na urina; partículas entre 10 e 50 nm, podem apresentar tempo de biodistribuição intermediário. No entanto de acordo com a morfologia e características da superfície podem induzir a fagocitose por macrófagos, o que

pode acarretar em acúmulo nos órgãos de metabolização e maturação de leucócitos como o fígado e o baço respectivamente. Nanopartículas maiores tendem a circular mais lentamente, ou seja, quanto maior o tamanho da nanopartícula maior o tempo de biodistribuição, além de aumentar a probabilidade de acúmulo em determinados orgãos e tecidos <sup>102</sup>.

O Z-Average é a média de tamanho obtida por DLS, esse dado somente dever ser utilizado quando 100% do sinal é referente a um único pico. O Índice de Polidispersão (IPd) representa a variação de tamanho em uma população de nanopartículas. Quanto menor o índice de polidispersão, menor é a variação de tamanho, ou seja, menos polidispersa é a suspensão coloidal. O índice de polidispersão (IPd) aceito para possível aplicação das AuNPs nesse estudo foi ≤ 0,25, no qual a variação de tamanho das AuNPs não ultrapassa o os limites de tamanho desejado. Foi realizado um estudo de estabilidade das AuNPs em relação ao pH e concentração de NaCI.

Na figura 18 são apresentadas as curvas de tamanho x pH e tamanho x [NaCl]%.



Figura 18. Curvas de tamanho das EGCG-AuNPs x pH (a) e tamanho x [NaCl](b).

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que as EGCG-AuNPs não apresentaram diferença significativa de tamanho por DLS na faixa de pH de 11 a 7,5. Na faixa de pH entre 5,5 e 4 as partículas apresentaram aumento de tamanho, que pode ser explicado pela perda parcial de cargas negativas em pH levemente ácido, levando a aglomeração leve sem perda total da estabilidade por repulsão eletrostática. Já em pH inferior a 4 as AuNPs perdem a estabilidade e ocorre aglomeração.

Na faixa de pH entre 6,5 e 6 ocorre o início do evento de aglomeração, este valor de pH pode levar a uma aglomeração moderada sem perda da estabilidade. O ambiente tumoral apresenta pH nessa faixa, o que pode ser um fator positivo, no qual as nanopartículas tendem a aglomeração, o que leva a um maior tempo de retenção destas nanoestruturas no ambiente tumoral. Portanto, as AuNPs desenvolvidas neste trabalho apresentam uma característica de resposta em pH tumoral que pode ser explorada em terapias ou diagnósticos que alvejam tumores sólidos <sup>103</sup>.

Quanto a adição de NaCl, as EGCG-AuNPs apresentaram tamanho estável por DLS até a concentração de 4% de NaCl. Em 5% começaram a apresentar aumento de tamanho, e acima de 5% as nanopartículas perderam a estabilidade e se aglomeraram. Os fluidos biológicos possuem 0,9% de NaCl, nessa condição as nanopartículas se mostraram estáveis, fator que contribui com a possível aplicação. Todavia, o fato destas AuNPs suportarem altas concentrações de NaCl é uma informação relevante nos processos de radiomarcação e desenvolvimento de kits liofilizados. Nessas situações geralmente ocorrem alterações na força iônica do meio, o que poderia levar ao colapso de nanopartículas sensíveis a concentrações de sais ou solutos superiores às encontradas nos fluídos fisiológicos.

Também foi verificada a estabilidade das EGCG-AuNPs-ASH-y em relação ao pH e adição de NaCl. Não foi observada alteração em relação a adição de NaCl. No entanto, em relação ao pH as EGCG-AuNPs-ASH-y mostraram ser mais estáveis do que as nanopartículas sem albumina, apresentando menor aumento de tamanho até pH 5 comparado com a amostra EGCG-AuNPs. Na figura 19 é apresentada a curva de tamanho por DLS x pH das EGCG-AuNPs-ASHy.



Figura 19. Curva de tamanho (nm) x pH obtida por DLS das EGCG-AuNPs-ASHy.

O uso da radiação ionizante na síntese de nanopartículas de ouro apresenta algumas vantagens relevantes em relação a estabilidade. Em um estudo realizado por Freitas (2020) a estabilidade ao longo do tempo (após 30 dias) das AuNPs sintetizadas pela via radiolíticas não apresentou alterações de tamanho relevantes, enquanto alguma agregação foi observada para as partículas reduzidas com EGCG. A falta de estabilidade, também foi observada em meio de alta força iônica <sup>78</sup>.

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

#### 4.1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na figura 20 estão apresentadas duas imagens de MET das EGCG-AuNPs(a) e EGCG-AuNPs-ASH<sub>X</sub>(b).

**Figura 20.** Imagens obtidas por MET, magnificação de 60kx: (a) EGCG-AuNPs e (b) EGCG-AuNPs-ASH<sub>x</sub>.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Foi observada morfologia predominantemente esférica em ambas as amostras. O recobrimento das nanopartículas na imagem (b) é perceptível, o que não é visto em (a), na qual não há proteína.

O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado por meio das ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup>, o mesmo utilizado para aquisição das imagens. Antes de obter as medidas das nanopartículas, as ferramentas do software são calibradas de acordo com a magnificação da imagem. Para a obtenção da média foram feitas as medições em 400 nanopartículas para cada amostra, utilizando critérios pré-definidos descritos anteriormente (3.3.5).

A figura 21 está representada a forma de obtenção das medidas obtidas por meio do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup>.

**Figura 21.** Imagem obtida por MET de EGCG-AuNPs e a obtenção do diâmetro médio das nanopartículas aferido com a utilização das ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup>.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Por meio desta técnica foi possível obter o diâmetro médio das partículas. (Ø core - termo inglês relativo a centro, núcleo etc.); a espessura do recobrimento das EGCG-AuNPs-ASHɣ (2 medidas/partícula); não foram obtidas medidas de partículas sobrepostas e nem das que estavam nos limites periféricos das imagens. Foram contadas no total 400 nanopartículas e as AuNPs foram consideradas esféricas para efeito de cálculo.

Para obter melhores resoluções das nanopartículas que continham albumina, as amostras foram recobertas com acetato de uranila - UO<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. O acetato de uranila além de ser utilizado como agente de contraste para obtenção de imagens de estruturas biológicas e outros materiais de baixo contraste em MET, esse composto também ajuda a diminuir a decomposição de amostras sensíveis ao feixe de elétrons durante a aquisição das imagens.

Na figura 22 são apresentadas imagens de MET em diferentes contrastes entre EGCG-AuNPs (a) e EGCG-AuNPs-ASHy (b), (c) e (d), sendo a última recoberta com acetato de uranila. **Figura 22.** Imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão (magnificação 240kx para a, b, c e 200kx para d: (a) EGCG-AuNPs, (b) e (c) EGCG-AuNPs-ASHy em diferentes contrastes do equipamento; (d) EGCG-AuNPs-ASHy recoberta com acetato de uranila  $(UO_2(CH_3COO)_2)$ .



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

O recobrimento da EGCG-AuNPs-ASHy com UO<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> permitiu melhor observação, tanto da morfologia como da extensão do recobrimento com albumina das AuNPs. Por meio do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup>, foram obtidas as médias dos valores de tamanho das AuNPs (*core* metálico) e a espessura do recobrimento proteico (*shell*). Com base no tamanho de uma molécula de albumina não é possível inferir a formação de uma monocamada proteica. Não foi verificada experimentalmente a possibilidade de acomodação ou sobreposição de mais de uma camada de moléculas de albumina ao redor do *core* metálico. Na tabela 3 são apresentados os dados obtidos por meio da técnica de MET.

**Tabela 3.** Valores dos parâmetros medidos por meio das ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup> na avaliação de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de ouro funcionalizadas com albumina via radiação gama (EGCG-AuNPs-ASHχ).

EGCG-AuNPs-ASHɣ	ø médio nm	Desvio Padrão
Core	18,61	2,10
Recobrimento	20,28	7,22
Total	38,89	9,32

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

As imagens obtidas em MET fornecem informações sobre a morfologia e as dimensões das AuNPs. Quando comparados os valores de tamanho obtidos por DLS (tabela 2) e MET, o tamanho do *core* metálico não apresentou diferença significativa entre o Z-Average (18,12 nm) e o ø médio (18,61 nm) obtidos por DLS e MET respectivamente. Em relação ao recobrimento com albumina as medidas foram significativamente diferentes, no DLS foi de 25,33 nm e em MET 38,9 nm. Essa diferença nas medidas pelas diferentes técnicas é justificada pelo fato das imagens em MET serem obtidas em um sistema após secagem das nanopartículas nas grades, já os dados por DLS são obtidos em um sistema hidrodinâmico, no qual as AuNPs estão em suspensão no meio e, as proteínas na superfície das nanopartículas encontram-se solvatadas <sup>104</sup>. Na tabela 4 são apresentados os dados obtidos por meio da técnica de MET.

**Tabela 4.** Valores dos parâmetros medidos por meio das ferramentas do software DigitalMicrographiGMS3<sup>®</sup> na avaliação de imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ouro.

EGCG_AuNPs_ASHy	ø médio nm	Desvio Padrão	Raio médio nm	r³ nm	Volume médio nm <sup>3</sup>
Core	18,61	2,10	9,31	805,81	3375,35
Recobrimento*	5,69	0,99	2,85	23,03	96,48
Total	28,89	2,79	14,44	3013,30	12622,07

\*No caso do recobrimento as medidas são relativas à espessura.

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

A média do Ø do *core* foi utilizada para calcular e inferir o volume médio do *core*, a média do número de átomos de Au/nanopartícula, a média da massa em µg e em mol de Au/nanopartícula. Para tanto, foi utilizado o volume da célula unitária da estrutura cristalina do ouro, que é aproximadamente 6,786774.10<sup>-29</sup> m<sup>3</sup>, sendo essa estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC), cuja célula unitária possui 4 átomos de Au. A tabela 5 mostra os valores inferidos por meio da manipulação matemática.

MEDIDAS	VALORES
Volume médio de AuNPs em nm <sup>3</sup> (MET)	3,375.10 <sup>-3</sup>
Volume da célula unitária de Au CFC nm <sup>3</sup> (teórico)	6,787.10 <sup>-29</sup>
Nº médio de células unitárias/nanopartícula (inferido)	4,973.10 <sup>16</sup>
Nº médio de átomos de Au/nanopartícula (inferido)	1,9891.10 <sup>17</sup>
Massa média em µg Au/nanopartícula (inferido)	6,5.10 <sup>-11</sup>
Nº de mols de Au/nanopartícula (inferido)	3,3.10 <sup>-7</sup>

**Tabela 5.** Valores obtidos utilizando os parâmetros aferidos por MET das AuNPs e o volume da célula unitária da estrutura cristalina do ouro.

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Utilizando os dados obtidos por ICP OES, descrito na sessão 4.1.3 e a massa média das AuNPs obtida acima, foi inferido a concentração e a molaridade de EGCG-AuNPs por mililitro de solução. Os valores são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Valores obtidos por ICP OES para concentração de Au contido na solução de EGCG-AuNPs e valores inferidos da concentração de nanopartículas.

MEDIDAS	VALORES
[Au] μg.mL <sup>-1</sup> (ICP)	47,6
[Au] mol.mL <sup>-1</sup> (ICP)	2,4.10 <sup>-7</sup>
[EGCG-AuNPs] µg.mL <sup>-1</sup> (inferido)	7,323.10 <sup>11</sup>
[EGCG-AuNPs] mol.mL <sup>-1</sup> (inferido)	1,217.10 <sup>-12</sup>

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

## 4.1.6 Eletroforese SDS-PAGE

Os dados obtidos por eletroforese em gel (SDS-PAGE) corroboram com a formação de ligações covalentes (bitirosina) entre as moléculas das nanopartículas após irradiação. O gel resultante da eletroforese é apresentado na figura 23.

**Figura 23.** Eletroforese com gel de poliacrilamida 12% das amostras de ASH-0,1% (1A); ASHy-0,1% (2A); ASH-0,5% (1B); ASHy-0,5% (2B); EGCG-AuNPs-ASH-0,1% (1C); EGCG-AuNPs-ASHy-0,1% (2C); EGCG-AuNPs-ASH-0,5% (1D); EGCG-AuNPs-ASHy-0,5% (2D); EGCG-AuNPs (C=Controle) e marcador com pesos moleculares conhecido (M).



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Neste ensaio foi possível observar a retenção das amostras submetidas à irradiação gama na origem do gel de poliacrilamida. Isso significa que essas amostras não eluiram através do gel quando o campo elétrico foi aplicado, o que sugere aumento de tamanho e formação de nanopartículas proteicas. Trata-se de um sistema denaturante, ou seja, as proteínas com estrutura terciária ou quaternária estão desenoveladas, assim, apresentam apenas estruturas primárias e/ou secundárias, promovendo a permeação dessas moléculas no gel. Isso pode

ser observado nas amostras não irradiadas (1A, 1B, 1C e 1D), as quais migraram com facilidade através do gel durante a corrida eletroforética (peso molecular ~67 kDa). A amostra C (controle), demonstra impossibilidade de permeação em gel de poliacrilamida 12% das nanopartículas de ouro (EGCG-AuNPs).

Caso o recobrimento proteico fosse apenas uma adsorção promovida por interações ou ligações fracas, todas as amostras apresentariam alguma permeação, mas a retenção na origem sugere a formação de ligações covalentes, o que reforça a ocorrência de reticulação entre as moléculas proteicas das amostras irradiadas (2A, 2B, 2C e 2D) evidenciado pela formação de bitirosina discutida anteriormente nos ensaios de fluorescência.

Portanto, a radiação ionizante pode ser utilizada para reticular recobrimentos proteicos em nanopartículas de ouro se a adição de agentes reticulantes químicos. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Flores *et al.* (2017), no qual a radiação ionizante foi utilizada para recobrir AuNPs por meio da reticulação de proteínas em sistema multicamada <sup>105</sup>.

## 4.2 Avaliação da Citotoxicidade

#### 4.2.1 Citotoxicidade in vitro

#### Método de absorção de vermelho neutro:

O teste de citotoxicidade *in vitro* minimiza o uso de animais de laboratório. É o primeiro passo a ser realizado para avaliar o nível de toxicidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos <sup>94</sup>. Os testes de citotoxicidade possibilitam encontrar a concentração capaz de inibir 50% do total de células viáveis (concentração inibitória - IC<sub>50</sub>).

Os resultados da citotoxicidade do agente redutor e da respectiva nanopartícula de ouro são apresentados na figura 24.

**Figura 24.** Curvas de viabilidade celular (%) em função da concentração das nanopartículas EGCG-AuNPs e o respectivo agente redutor EGCG no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro em células do tecido conjuntivo de camundongo, linhagem NCTC-L929 (CCIAL 020)



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Foi possível obter IC<sub>50</sub> do fitoquímico epigalocatequina-3-galato (EGCG), aproximadamente 98,5%, o que corresponde à concentração de 361  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. As nanopartículas de ouro obtidas com o fitoquímico (EGCG-AuNPs) não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas. Foram utilizados o PEAD e o látex de borracha como controles negativo e positivo, respectivamente.

Na figura 25 são apresentas as curvas de viabilidade celular (%) das nanopartículas de ouro com e sem o recobrimento proteico, antes e após a irradiação na dose de 10 kGy. **Figura 25.** Curvas de viabilidade celular (%) em função da concentração das nanopartículas EGCG-AuNPs sem proteína, com ASB e ASH, irradiadas a 10 kGy, não irradiadas e, os controles negativos (PEAD) e positivo (látex) no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro em células do tecido conjuntivo de camundongo, linhagem NCTC-L929 (CCIAL 020).



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

De acordo com os resultados obtidos, não foi possível obter a IC<sub>50</sub>, ou seja, as amostras não apresentaram citotoxicidade aguda *in vitro* nas concentrações testadas para essa linhagem celular murina segundo a norma ISO 10993-5 (ISO 2009) <sup>89</sup>. As nanopartículas de ouro sem albumina (EGCG-AuNPs irradiada) apresentou maior viabilidade celular em todas as concentrações em relação a EGCG-AuNPs não irradiada, esse resultado pode significar que o fitoquímico EGCG, que apresentou citotoxicidade quando testado isoladamente (Figura 24), sofreu alterações em sua composição quando submetido a radiação ionizante, na dose de 10 kGy, diminuindo seu potencial citotóxico pelo método de incorporação

do vermelho neutro em células do tecido conjuntivo de camundongo, linhagem NCTC-L929 (CCIAL 020).

Todas as amostras apresentaram viabilidade celular acima de 50%. Esses dados corroboram com dados encontrados na literatura sobre a biocompatibilidade de nanopartículas de ouro. Já a albumina é uma das principais proteínas plasmáticas e a sua toxicidade está mais relacionada a reações imunológicas do que a toxicidade intrínseca da proteína <sup>102,106</sup>.

# • Método colorimétrico do MTS:

A avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTS foi realizada utilizando três linhagens celulares: V79-4 (células de tecido pulmonar de hamster chinês macho); MDA-MB 231 (carcinoma de mama humano) e PC3 (câncer de próstata humano). Foram utilizados meio de cultura DMEM e DMSO com controles negativo e positivo, respectivamente. Na figura 26 estão apresentados os dados de viabilidade celular das linhagens expostas às nanopartículas de ouro na proporção 1:1 (NPs:DMEM).

**Figura 26.** Gráfico da viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTS das linhagens celulares V79-4 (células de tecido pulmonar de hamster chinês macho); MDA-MB 231 (carcinoma de mama) e PC3 (câncer de próstata humano), expostas às nanopartículas de ouro (EGCG-AuNPs) na proporção 1:1 (NPs:DMEM) e aos controles negativo e positivo, DMEM e DMSO respectivamente.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Com base nos resultados obtidos, as EGCG-AuNPs não apresentaram toxicidade aguda pelo método colorimétrico do MTS, nas linhagens celulares testadas. A linhagem de câncer de próstata humano apresentou viabilidade celular acima de 50%, mesmo expostas a 100% de DMSO (controle negativo). Esse dado corrobora com os dados encontrados na literatura, nos quais a linhagem PC3 é de fácil cultivo e apresenta resistência mesmo na ausência de condições de homeostase.

É válido destacar que a não toxicidade das AuNPs tanto em células sadias como em células tumorais corrobora com a potencial aplicação na terapia e diagnóstico, no entanto é preciso verificar se as AuNPs possuem maior afinidade pelas células tumorais em relação a células saudáveis, podendo ser direcionadas à sítios específicos como os receptores superexpressos por células tumorais, permitindo assim aplicações sistêmicas e não somente intratumorais <sup>102,106</sup>.

#### 4.2.2 Toxicidade in vivo: peixe zebra - Zebrafish

Os ovos de peixe-zebra fertilizados foram expostos a cinco concentrações de EGCG-AuNPs e seu respectivo redutor EGCG por 96 horas. A primeira concentração testada das nanopartículas e do agente redutor é equivalente a 50% da concentração inicial diluída em 50% de meio. Assim, as concentrações iniciais de Au (ICP) e seu agente redutor foram de 18 µg.mL<sup>-1</sup> e 183 µg.mL<sup>-1</sup> para EGCG-AuNPs e EGCG.

A mortalidade embrionária no controle negativo foi inferior ou igual a 10% e 100% dos embriões no controle positivo foram considerados mortos no final do período de exposição, conforme exigido para a validade do teste. A figura 27 é apresentado os valores das médias e o desvio padrão da taxa de letalidade (%) de acordo com a concentração das amostras.

**Figura 27.** Taxa de letalidade do peixe-zebra no estágio embrião-larval exposto EGCG e EGCG-AuNPs durante período de 96 horas.



■EGCG ■EGCG-AuNPs

A exposição do embrião às amostras de EGCG e EGCG-AuNPs não resultou em um aumento na taxa de letalidade, que foi inferior a 20%. Não foram observadas malformações no desenvolvimento dos organismos em todas as amostras testadas independentemente da concentração. O grupo controle, apesar de não conter amostras (AuNPs ou EGCG) apresentou letalidade próxima de 10%, tratando-se de ensaios biológicos o valor encontra-se dentro das normas estabelecidas, que consideram até 10% de letalidade, mesmo nos grupos controle, um valor aceitável, devido a variabilidade entre os organismos <sup>94</sup>.

A eclosão tem sido amplamente utilizada como parâmetro no estágio embrionário dos peixes<sup>92</sup>. No presente estudo, foi observado o atraso na incubação do peixe-zebra. A exposição dos embriões ao fitoquímico EGCG na concentração de 92,5 µg.mL<sup>-1</sup> mostrou diferença estatística na taxa de eclosão em relação ao controle, no período de 96 horas como apresentado na tabela 4 e na figura 28. Nas demais concentrações de EGCG não houve diferença estatísticamente significativa em comparação ao controle.

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

EGCG	Eclosão (%)			
(µg.mL ')	48 h	72 h	96 h	
0	11.1 (0)	100 (0)	100 (0)	
11.54	12.5 (0.5)	97 (4.2)	97 (4.2)	
23.12	20 (0.8)	87.3 (9.5)	98.6 (1.9)	
46.25	2.7 (0.2)	11.6 (12.6)	57.5 (18.4)	
92.5	0 (0)	0 (0)	1.3* (1.8)	
185	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

**Tabela 7.** Taxa de eclosão de larvas de peixe zebra às 48, 72 e 96 horas durante a exposição ao EGCG.

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

**Figura 28.** Imagens obtidas por microscopia óptica: (A) Larva controle tratada eclodiu com 96 horas pós fecundação (hpf); (B) o embrião exposto ao fitoquímico EGCG na concentração de 92,5 µg.mL<sup>-1</sup> não eclodiu com 96 hpf, mostrando o atraso significativo na eclosão das larvas de peixe zebra.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Sabe-se que os sinais físicos e químicos detectados pelo embrião ativam a produção da enzima relacionada a eclosão (corionase), que degrada a camada interna do córion e permite movimentos que proporcionam o evento de eclosão. Diferentes mecanismos tóxicos podem justificar atrasos na eclosão ou falha, como

a indução de função anormal da enzima corionase e/ ou a incapacidade de larvas emergentes de romper as cascas dos ovos <sup>107-109</sup>.

Alguns metais podem inibir o processo de incubação de peixes <sup>108</sup>. Dave e Xiu (1991) relataram o atraso na eclosão de embriões de *Danio rerio* (peixe zebra) expostos ao cobre e níquel. Os autores sugerem que o cobre pode inativar a enzima corionase e causar distúrbios osmóticos que também podem afetar os movimentos musculares necessários para quebrar o ovo. O atraso do nascimento do peixe zebra também foi verificado por outros autores em estudos posteriores <sup>110-113</sup>.

Os embriões de peixe-zebra absorvem compostos do meio através da pele e brânquias nos estágios embrionários <sup>114</sup>. No entanto, a penetração de substâncias através do córion pode variar dependendo das propriedades do composto e da atração eletrostática entre as substâncias e o córion <sup>115</sup>. Devido a essa permeabilidade limitada do córion, o teste de toxicidade de embriões de peixes pode resultar em falsos-negativos <sup>109</sup>, o que justifica realizar ensaios de FET com a remoção enzimática do córion e o ensaio modificado, no qual as amostras foram micro injetadas dentro do saco vitelínico.

## • Ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion:

No ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion (adaptação do FET na qual o invólucro do embrião de peixe zebra foi com removido com a utilização da enzima pronase). Esse teste serviu para compreender a influência do córion em relação a toxicidade as AuNPs.

Na tabela 8 são apresentados os dados de letalidade percentual em relação a concentração de EGCG-AuNPs em comparação com o controle negativo (meio MS).

EGCG-AuNP	Letalidade
Controle Meio MS	4 (7%)
3,12%	14 (23%)
6,25%	19 (32%)
12,5%	20 (33%)
25%	14 (23%)
50%	16 (27%)
100%	14 (23%)

**Tabela 8.** Resultados obtidos do ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion.

Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

O método estatístico não paramétrico Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et al., 1977) é usado para calcular a CL<sub>50</sub><sup>96</sup>. Na figura 29 está apresentado o gráfico após análise estatística do ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion. Neste ensaio não foi possível encontrar a CL<sub>50</sub> para EGCG-AuNPs, o que sugere que as nanopartículas não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas.

**Figura 29.** Taxa de letalidade do peixe-zebra no estágio embrião-larval sem córion exposto às EGCG-AuNPs durante período de 96 horas.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

Em comparação com o FET tradicional, no ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion ocorreu um ligeiro aumento da letalidade, ultrapassando 30% nas concentrações de 6,25 e 12,5%, sendo que todas as concentrações apresentaram mortalidade acima de 20%. No FET tradicional as EGCG-AuNPs não atingiram 10% nas concentrações testadas. Portanto, o córion desempenha uma função protetora importante frente a interação nanopartículas-embrião. Provavelmente, as EGCG-AuNPs não interferem nas funções de troca gasosa e nutrientes desempenhadas pelo córion dos embriões <sup>93</sup>.

# • Microinjeção em embriões de peixe zebra:

Os embriões foram expostos a soluções coloidais de EGCG-AuNPs e ao fitoquímico EGCG durante 96 horas. As concentrações dos AuNPs são relativas ao Au metálico (ICP-OES). As concentrações testadas foram de 36 µg.mL<sup>-1</sup> e 370 µg.mL<sup>-1</sup> para EGCG-AuNPs e EGCG, respectivamente. A mortalidade de embriões no controle utilizando água e controle de injeção foi inferior a 20%. Na figura 30 são apresentados os dados de média e desvio padrão da taxa de letalidade (%).

**Figura 30.** Ensaio modificado de FET por microinjeção em embriões de peixe zebra expostos a concentração de EGCG-AuNPs e EGCG, bem como controles: controle-H<sub>2</sub>O) e controle por lesão da microinjeção).



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

A letalidade dos organismos para ambas as amostras foi inferior a 50%, resultado diferente do FET tradicional. Possivelmente, o fitoquímico EGCG possui maior interação com o exterior do córion, impedindo a troca de gases, causando atraso no desenvolvimento dos embriões, o que é menos pronunciado no ensaio de microinjeção, no qual as amostras foram injetadas diretamente no saco vitelino dos embriões. Comparado com os ensaios anteriores, nos quais a letalidade foi inferior à apresentada no teste com a microinjeção, ocorreu um ligeiro aumento da letalidade mesmo nos grupos controles, esse ocorrido provavelmente está relacionado a lesão causada pela microinjeção. Não foram observadas malformações no desenvolvimento dos organismos em nenhuma das amostras testadas.

Os resultados observados nos ensaios com embriões de peixe zebram estão de acordo com os dados encontrados na literatura em relação às AuNPs obtidas com base nos métodos de nanotecnologia verde, que descrevem nanopartículas biocompatíveis, e garantem a entrega segura destas nanoestruturas aos tecidos e, como consequência a segurança nas aplicações biomédicas, devido à ausência de toxicidade <sup>116</sup>.

## 4.3 Estudo in vitro da internalização Celular das EGCG-AuNPs: CytoVIVA

Na figura 31 é mostrada a imagem obtida por microscopia hiperespectral da linhagem de células de câncer de mama humano (MDA-MB 231). Após 2 horas de exposição às nanopartículas de ouro (EGCG-AuNPs), foi possível observar a internalização das nanopartículas no interior das células tumorais. No entanto, essa internalização provavelmente ocorre a nível citoplasmático. Na imagem (b) da figura 31 estão destacados os núcleos celulares, os quais não apresentam sinais evidentes de nanopartículas de ouro. Provavelmente a carioteca interfere na passagem de EGCG-AuNPs.

**Figura 31.** Imagem da linhagem de células de câncer de mama humano (MDA-MB 231) após 2 horas de exposição às nanopartículas de ouro (EGCG-AuNPs), (a) Imagem em tamanho real com a escala em µm e (b) imagem ampliada.



Fonte: BATISTA, J.G.S. (2020).

### 4.4 Radiomarcação das Nanopartículas de Ouro

## 4.4.1 Radiomarcação direta com <sup>99m</sup>Tc

Os rendimentos da radiomarcação direta foram de 63,80% e 83,98% para as amostras EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASH<sub>Y</sub>, respectivamente. É conhecido na literatura que a radiomarcação direta de albumina com <sup>99m</sup>Tc, o que corrobora com uma maior porcentagem de marcação da amostra com albumina <sup>117</sup>. O ensaio mostrou que a marcação direta com <sup>99m</sup>Tc ocorreu. No entanto, ambos os resultados obtidos não apresentaram pureza radioquímica suficiente para um potencial radiofármaco (≥ 90%). Para tanto, se faz necessário otimizar o método, no qual precisam ser avaliadas diferentes condições de reação, como concentração direta seria uma rota viável para síntese do radiofármaco, sendo essa maneira a mais simples, rápida e barata comparada às outras formas de radiomarcação com esse radionuclídeo.

O método de radiomarcação com  $^{99m}$ Tc utiliza íons Sn<sup>2+</sup> para promover a redução do  $^{99m}$ Tc<sup>7+</sup> em  $^{99m}$ Tc<sup>3+</sup>/ $^{99m}$ Tc<sup>4+</sup> (estado de oxidação desejável para a

radiomarcação). Para tanto, se faz necessário a acidificação do meio, sendo que as nanopartículas desenvolvidas nesse trabalho não são estáveis em pH inferiores a 4,5. Portanto, o método de radiomarcação indireta seria o método escolha para este ensaio.

# 4.4.2 Radiomarcação indireta com <sup>99m</sup>Tc

A pureza do complexo <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> avaliada por CLAE foi de 99,51% e 99,46 para a radiomarcação das amostras EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASH<sub>y</sub>, respectivamente. Os resultados da CCD obtidos nesse ensaio de radiomarcação indireta com <sup>99m</sup>Tc(CO) foram de 91,16% e 89,63%. No entanto, com base na metodologia empregada não foi possível separar as nanopartículas radiomarcadas do coloide de <sup>99m</sup>Tc, que é considerado uma impureza radioquímica.

A rota de radiomarcação indireta se apresentou viável para dar continuidade aos estudos com ambas as amostras. As nanopartículas permaneceram estáveis durante a radiomarcação e após o decaimento radioativo do <sup>99m</sup>Tc (~60 horas, equivalente a 10 meias-vidas). No entanto, é preciso buscar meios alternativos e eficazes para a validação do método de estabilidade e pureza radioquímica. Uma alternativa que pode ser testada em estudos futuros é o uso de sistemas cromatográficos de exclusão molecular.

Vale ressaltar que são diversas as possibilidades de radiomarcação de AuNPs. Além dos emissores gama usados em SPECT, existe uma variedade de emissores de pósitron que podem ser utilizados na medicina nuclear. Esses emissores apresentam vantagens em relação aos emissores gama, pois podem ser produzidos em pequenas instalações (cíclotrons) além de gerar imagens com maior qualidade e precisão em tomógrafos tipo PET. A utilização do ouro para aplicações em nanomedicina e possibilita ainda o uso dos isótopos <sup>198</sup>Au e <sup>199</sup>Au como demonstrados em estudos mencionados nesta pesquisa <sup>66,70,75</sup>.

Publicações recentes demonstram os avanços no desenvolvimento de nanopartículas de ouro obtidas por métodos verdes e radiação ionizante. Esses estudos corroboram com a metodologia estabelecida no presente trabalho, no qual a radiação ionizante foi utilizada na funcionalização das nanopartículas promovendo um recobrimento eficaz com albumina. Pesquisadores da Universidade de Quilmes na Argentina (UNQ) publicaram em 2017 um método semelhante ao desenvolvido nesta tese, com base no uso da radiação para a preparação revestimentos proteicos de albumina em AuNPs. Nesse método, a solução albumina foi previamente adicionada à suspensão de AuNP e parcialmente agregado por adição de cossolvente. As amostras foram irradiadas em uma fonte de <sup>60</sup>Co <sup>105</sup>.

As propriedades únicas das nanopartículas de ouro aliadas às características intrínsecas das proteínas permitem produzir inúmeros compostos nanoestruturados com potencial aplicação na nanomedicina. A combinação da energia das radiações ionizantes possibilita a reticulação de nanoestruturas sem necessitar de agentes químicos comumente tóxicos, como os compostos tióis usados com frequência como ligantes ou reticulantes em reações de funcionalização de nanopartículas <sup>105</sup>.

Outra vantagem do uso da radiação ionizante na produção de nanomateriais para aplicações biomédicas é a esterilização simultânea de acordo com a dose, nível de contaminação inicial e características do meio e do material <sup>14,78</sup>.

A funcionalização das superfícies das AuNPs confere maior solubilidade, estabilidade e interação com células e / ou outras biomoléculas. Além de melhorar suas propriedades físico-químicas, a modificação da superfície com proteínas aumenta a biocompatibilidade em comparação com AuNPs. No entanto, a maioria das proteínas perdem parcialmente sua conformação nativa quando interagem com a superfície AuNP altamente estruturada <sup>118</sup>. Portanto, os locais de reconhecimento de proteínas disponíveis em sua superfície são parcialmente perdidos por esta interação. No entanto, a disponibilidade de conteúdo proteico na superfície das AuNPs permite o ancoramento de moléculas de reconhecimento como anticorpos e possibilitam a entrega de fármacos, genes e peptídeos e, esse conceito pode ser aplicado para as mais diversas proteínas <sup>62,98,106,119,120</sup>.

# 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A nanotecnologia verde provou ser uma ferramenta valiosa na síntese de nanopartículas de ouro em relação à toxicidade, não exigindo etapas de eliminação de solventes e substâncias potencialmente tóxicas. O uso da radiação gama possibilitou a funcionalização das nanopartículas de ouro com albumina do soro humano, levando a um aumento na estabilidade, observado pela carga de superfície e submissão das nanopartículas a diferentes potenciais hidrogeniônicos e soluções hipertônicas de NaCl, nas quais as nanopartículas mantiveram seu volume hidrodinâmico sem formar aglomerados ou precipitados.

Relatamos que a toxicidade dos AuNPs variou de acordo com o ensaio. Testes de citotoxicidade em células de roedores revelaram a toxicidade do agente redutor EGCG e foi possível obter a IC<sub>50</sub> para esse fitoquímico no teste realizado. Já as EGCG-AuNPs não apresentaram citotoxicidade nas linhagens celulares testadas, o que comprova a potencial aplicação como um biomaterial em nanomedicina.

No FET, o agente redutor EGCG atrasou o processo de eclosão dos embriões de peixe zebra. Tanto no ensaio de toxicidade aguda com embriões de peixe zebra sem córion, como no teste em que as AuNPs foram injetadas no interior do saco vitelino dos embriões, não foram encontradas concentrações que causassem efeitos tóxicos em 50% dos organismos.

Estudos futuros sugerem a quantificação do conteúdo metálico em embriões para que possamos entender os efeitos crônicos e cumulativos das nanopartículas estudadas. Sugere-se a realização de ensaios com adultos de peixe zebra, a fim de obter maiores informações sobre os mecanismos de toxicidade das nanopartículas em exposições aguda e crônica.

Nos estudos de internalização *in vitro* das nanopartículas utilizando as linhagens tumorais MDA-MB 231 e PC3 foi possível verificar qualitativamente a internalização das AuNPs.

Os ensaios de radiomarcação das EGCG-AuNPs e EGCG-AuNPs-ASHy, precisam ser otimizados quanto a estabilidade e pureza radioquímica. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, tornando inviável a realização dos ensaios *in vivo* com uso de pequenos roedores. É necessário atingir pelo menos

90% de pureza radioquímica para que seja possível verificadar a biodistribuição e a farmacocinética das NPs radiomarcadas.

As nanopartículas de ouro recobertas com albumina (*core/shell*), produzidas com base nos princípios da nanotecnologia verde e aplicação de radiação ionizante, apresentam grande potencial para aplicação na terapia e diagnóstico de câncer. A importância do recobrimento com albumina está relacionada a afinidade dessa proteína com os receptores glicoproteicos GP60, encontrados em diversas células tumorais e a capacidade da albumina de transportar e entregar fármacos e agentes terapêuticos ou de diagnóstico de modo seletivo e direcionado.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; WEEKS, C.E.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; REINERS, J. Studies on the Mechanisms Involved in Multistage Carcinogenesis in Mouse Skin. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.18, n. 1, p. 99-119, 1982.

2. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica.* 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier. Torre, L. A., R. L. Siegel, E. M. Ward, e A. Jemal. 2016. I-15-0578. 2006.

3. TORRE, L.A.; SIEGEL, R.L.; WARD, E.M.; JEMAL, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.

4. NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 2, 2015.

5. SIEGEL, R.W; HU, E.; COX, D.M. et al. *Nanostructure Science and Technology.* WTEC Panel. 1999.

6. FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer.* v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

7. SANCHEZ, F.; KONSTANTIN, S. Nanotechnology in concrete - A review. *Construction and Building Materials.* v. 24, n. 11, p. 2060-2071, 2010.

8. SINGH, R.; JAMES W.L. Nanoparticle-Based Targeted DrugDelivery. *Experimental and Molecular Pathology.* v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

9. BOTTERO, J.Y.; AUFFAN, M.; BORSCHNEK, D. et al. Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches. *Comptes Rendus – Geoscience.* v. 347, n. 1, p. 35-42, 2015.

10. SVENDSEN, C.; WALKER, L.A.; MATZKE, M. et al. Key principles and operational practices for improved nanotechnology environmental exposure assessment. *Nature Nanotechnology.* v. 15, n. 9, p. 731-742, 2020.

11. DANIEL, M.; CHRISTINE, M.C.; DIDIER, A. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chemical Reviews.* v. 104, p. 293-346, 2004.

12. HERRMANN, K.; LARSON, S.M.; WEBER, W.A. Theranostic concepts: More than just a fashion trend-introduction and overview. *Journal of Nuclear Medicine.* v. 58:1S-2S, 2017.

13. SANNA, V.; PALA, N.; DESSÌ, G. et al. Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities. *International Journal of Nanomedicine.* v. 9, n. 1, p. 4935-4951, 2014.

14. FREITAS, L.F.; VARCA, G.H.C.; BATISTA, J.G.S.; LUGÃO, A.B. An overview of the synthesis of gold nanoparticles using radiation technologies. *Nanomaterials*. v. 8, n. 11, 2018.

15. ANTHONY, FRANCISCO. Francisci Antonii. *Panacea Aurea: Sive Tractatus Duo De Ipsius Auro Potabili*. Nunc primum in Germania ex Londinensi exemplari excusi Hamburgi: ex Bibliopolio Frobeniano, 1618. Disponível em: <<u>https://books.google.com.br/books>. Acesso em: set. 20</u>19.

16. FARADAY, M. The Bakerian Lecture. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* v. 147, p. 145-181, 1857.

17. ZSIGMONDY, R. Ueber wässrige Lösungen metallischen Goldes. *Justus Liebig's Annalen Der Chemie*. v. 301, n. 1, p. 29-54, 1898.

18. SVERDBERG, T. Die methoden zur Herstellung kolloider Lösungen anorganischer Stoffe. Ein Hand- Und Hilfsbuch Für Die Chemie Und Industrie Der Kolloide. *Dresden: Theodor Steinkopff*. 1909.

19. The Keeley "Gold Cure" for Inebriety. *British medical jornal.* v. 2 (1645), p. 85-86. 1892. Disponível em: <<u>https://www.bmj.com/content/2/1645/85</u>>. Acesso em: set: 2019.

20. GUISBIERS, G.; MEJÍA-ROSALES, S.; LEONARD DEEPAK, F. Nanomaterial properties: Size and shape dependencies. *Journal of Nanomaterials.* 2012.

21. GERT, R.; HUBERT, R.; GÖRAN, L. et al. *Considerations on a Definition of Nanomaterial for Regulatory Purposes.* Publications Office. 2010.

22. BENLI, B. Nanoteknoloji ve antik çağlara uzanan killi nanoyapılar. *Kil Bilimi* ve *Teknolojisi Dergisi.* v. 1, n. 3, p. 143-162, 2009.

23. FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, C. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*. v. 40, n. 4, p. 270-277, 2007.

24. BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters.* v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.

Feynman, R.P. *The Nobel Prize in Physics 1965*. Disponível em: <a href="https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1965/summary">https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1965/summary</a>>. Acesso em: jun. 2019.

26. TOMA, H.E. O mundo nanométrico: a dimensão do novo século. *Oficina de Textos*. 2 ed., p. 18, 2009.

27. CURL, R.F.; SMALLEY, R.E. Probing c60. *Science.* v. 242 (4881) p. 1017-1022, 1988.

28. SHI, J. Cancer nanomedicine: Progress KANTOFF PW, WOOSTER R, FAROKHZAD OC. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*. v. 17 n. 1, p. 20-37, 2017.

29. WONG, X.Y.; SENA-TORRALBA, A.; ÁLVAREZ-DIDUK, R.; MUTHOOSAMY, K.; MERKOÇI, A. Nanomaterials for Nanotheranostics: Tuning Their Properties According to Disease Needs. *ACS Nano.* v. 14, n. 3, p. 2585-2627, 2020.

30. GIL, P.R.; PARAK, W.J. Composite Nanoparticles Take Aim at Cancer. **ACS** *Nano.* v. 2, n. 11, p. 2200-2205, 2008.

31. SPERLING, R.A.; GIL, P.R.; ZHANG, F.; ZANELLA, M.; PARAK, W.J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. v. 37, n. 9, p. 1896-1908, 2008.

32. GUERRA, F.D.; ATTIA, M.F.; WHITEHEAD, D.C.; ALEXIS, F. Nanotechnology for environmental remediation: Materials and applications. *Molecules*. v. 23, n. 7, 2018.

33. DREADEN, E.C.; ALKILANY, A.M.; HUANG, X.; MURPHY, C.J.; EL-SAYED, M.A. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews.* v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

34. EL-SAYED, M.A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts of Chemical Research*. v. 34, n. 4, p. 257-264, 2001.

35. KREIBIG, U.; VOLLMER, M. Optical Properties of Metal Clusters. *Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*. v. 25, 1995.

36. STORHOFF, J.J.; LUCAS, A.D.; GARIMELLA, V.; BAO, Y.P.; MÜLLER, U.R. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nature Biotechnology*. v. 22, n. 7, p. 883-887, 2004.

37. MIRKIN, C.A.; LETSINGER, R.L.; MUCIC, R.C.; STORHOFF, J.J.A DNAbased method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* v. 382 (6592), p. 607–609, 1996.

38. BAPTISTA, P.; DORIA, G.; HENRIQUES, D.; PEREIRA, E.; FRANCO, R. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Biotechnology*. v. 119, n. 2, p. 111-117, 2005.

39. DORIA, G.; FRANCO, R.; BAPTISTA, P. Nanodiagnostics: Fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. *IET Nanobiotechnology.* v. 1, n. 4, p. 53-57, 2007

40. BARNES, W.L.; DEREUX, A.; EBBESEN, T.W. Surface plasmon subwavelength optics. *Nature.* v. 424 (6950), p. 824-830, 2003.

41. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. v. 100 (1), p. 57-70, 2000.

42. ETZIONI, R.; URBAN, N.; RAMSEY, S.; MCINTOSH, M.; SCHWARTZ, S.; REID, B.; HARTWELL, L. The case for early detection. *Nature Reviews Cancer.* v. 3, n. 4, p. 243-252, 2003.

43. CONDE, J.; DORIA, G.; BAPTISTA, P. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer. *Journal of Drug Delivery*. v. 2012, p. 1-12, 2012.

44. ISMAIL, A.; RANI, A.; MOHAMAD, K.A.; GHOSH, B.K.; PIEN CHEE, F. *Current advances in microdevices and nanotechnology*. Penerbit UTHM, Malaysia. Cap. 2. The synthesis of gold nanoparticles and its extensive applications. p. 19-40, 2019.

45. CAO, Y.W.C.; JIN, R.; MIRKIN, C.A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*. v. 297 (5586), p. 1536-1540, 2002.

46. MAHL, D.; DIENDORF, J.; MEYER-ZAIKA, W.; EPPLE, M. Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 377, n. 1-3, p. 386-392, 2011.

47. TURKEVICH, J.; COOPER, P.; HILLIER J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. v. 55 (c), p 55-75, 1951.

48. BRUST, M.; MERRY, W.; DONALD, B.; DAVID, J.S.; ROBIN, W. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. n. 7, p. 801-802, 1994.

49. PEER, D.; KARP, J.M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O.C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. v. 2, n. 12, p. 751-760, 2007.

50. SPERLING, R.A.; PELLEGRINO, T.; LI, J.K.; CHANG, W.H.; PARAK, W.J. Electrophoretic separation of nanoparticles with a discrete number of functional groups. *Advanced Functional Materials.* v. 16, n. 7, p. 943-0948, 2006.

51. WALKER, C.H.; JOHN V.St.J.; WISIAN-NEILSON, P. Synthesis and Size Control of Gold Nanoparticles Stabilized by Poly(methylphenylphosphazene). *Journal of the American Chemical Society*. v. 123, n. 16, p. 3846-3847, 2001.

52. KATTESH, V.K. *EGCG stabilized gold nanoparticles and method for making same*. Int CI References Cited US patent documents. 2016.

53. MITTAL, A.K.; YUSUF, C.; UTTAM, C.; HAND, B. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*. v. 31, n. 2, p. 346-56, 2013.

54. PANDEY, S.; GOLDIE, O.; ASHMI, M.; MADHURI, S. Green Synthesis of Highly Stable Gold Nanoparticles using Momordica charantia as Nano fabricator. *Scholars Research Library Archives of Applied Science Research.* v. 4, n. 2, p. 1135-1141, 2012.

55. KHOOBCHANDANI, M.; KATTI, K.; MAXWELL, A.; FAY, W.P.; KATTI, K.V. Laminin receptor-avid nanotherapeutic EGCg-AuNPs as a potential alternative therapeutic approach to prevent restenosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 3, 2016.

56. KATTI, K.; NRIPEN, C.; RAVI, S.; AJIT, Z.; THILAKAVATHI, S.; RAJESH, R.K.; RAGHURAMAN, K.; KATTESH, V.K. Green nanotechnology from cumin phytochemicals: Generation of biocompatible gold nanoparticles. International *Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine*. v. 1, n. 1, 2009.

57. ABRAHAM, A.N.; SHARMA, T.K.; BANSAL, V.; SHUKLA, R. Phytochemicals as Dynamic Surface Ligands to Control Nanoparticle-Protein Interactions. *ACS Omega*, v. 3, n. 2, p. 2220-2229, 2018.

58. KATTESH, V.K. Provisional application n. 61/628. *Int CI References Cited US patent documents.* 2008.

59. SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011.

60. LAKSHMI, S.P.; REDDY, A.T.; KODIDHELA, L.D.; VARADACHARYULU, N.C. The tea catechin epigallocatechin gallate inhibits NF-κB-mediated transcriptional activation by covalent modification. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* v. 695, 2020.

61. LI, T.; LI, F.; LIU, X.; LIU, J.; LI, D. Synergistic anti-inflammatory effects of quercetin and catechin via inhibiting activation of TLR4–MyD88-mediated NF-κB and MAPK signaling pathways. *Phytotherapy Research.* v. 33, n. 3, p. 756-767, 2019.

62. CORTES, J.; SAURA, C. Nanoparticle albumin-bound (nab<sup>™</sup>)-paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer, Supplement*. v. 8, n. 1, p. 1-10, 2010.

63. CHANDA, N.; KATTUMURI, V.; SHUKLA, R.; ZAMBRE, A.; KATTI, K.; UPENDRAN, A.; KULKARNI, R.R. et al. Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 107, n. 19, p. 8760–8765, 2010.

64. CHEN, F.; EHLERDING, E.B.; CAI, W. Theranostic nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine*. v. 55, n. 12, p. 1919-1922, 2014.

65. HAMPP, E.; BOTAH, R.; ODUSANYA, O.S.; ANUKU, N.; MALATESTA, K.A.; SOBOYEJO, W.O. Biosynthesis and adhesion of gold nanoparticles for breast cancer detection and treatment. *Journal of Materials Research*. v. 27, n. 22, p. 2891-2901, 2012.

66. CHANDA, N.; PARA, K.; LISA, D.W.; RAVI, S.; AJIT, Z.; TERRY, L.C.; HENDRIK E. et al. Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. v. 6, n. 2, p. 201– 209, 2010.
67. HU, J.; ZHANG, G.; LIU, S. Enzyme-responsive polymeric assemblies, nanoparticles and hydrogels. *Chemical Society Reviews*. v. 41, n. 18, p. 5933–5949, 2012.

68. ROY, K.; LAHIRI, S. A green method for synthesis of radioactive gold nanoparticles. *Green Chemistry.* v. 8, n. 12, p. 1063-1066, 2006.

69. CHANDA, N.; RAVI S.; AJIT, Z.; SWAPNA, M.; RAJESH, R.K.; KAVITA, K.; KIRAN B. et al. An effective strategy for the synthesis of biocompatible gold nanoparticles using cinnamon phytochemicals for phantom CT imaging and photoacoustic detection of cancerous cells**. Pharmaceutical Research**. 28, n. 2, p. 279-291, 2011.

70. AL-YASIRI, A.Y.; KHOOBCHANDANI, M.C.; CUTLER, S.; WATKINSON, L.; CARMACK, T.; SMITH, C.J.; KUCHUK, M.; LOYALKA, S.K.; LUGÃO, A.B.; KATTI, K.V. Mangiferin functionalized radioactive gold nanoparticles (MGF-198 AuNPs) in prostate tumor therapy: green nanotechnology for production, in vivo tumor retention and evaluation of therapeutic efficacy. *Dalton Transactions*. v. 46, n. 42, p. 14561-14571, 2017.

71. JEON, J. Review of therapeutic applications of radiolabeled functional nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences.* v. 20, n. 9, 2019.

72. CHILUG, L.E.; LEONTE, R.A.; PATRASCU, M.E.B.; ION, A.C.; TUTA, C.S.; RAICU, A.; MANDA, G.; NICULAE, E.D. In vitro binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with68Ga-DOTA conjugated peptides. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. v. 311, n. 2, p. 1485-1493, 2017.

73. PATRA, C.R.; RESHAM, B.; DEBABRATA, M.; PRIYABRATA M. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 62, n. 3, p. 346-361, 2010.

74. LUNA-GUTIÉRREZ, M.; G. FERRO-FLORES, B.E.; OCAMPO-GARCÍA, C.L.; SANTOS-CUEVAS, N.; JIMÉNEZ-MANCILLA, L.M.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, E.; AZORÍN-VEGA, K. ISAAC-OLIVÉ. A Therapeutic System of 177Lu-Labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells. *Journal of the Mexican Chemical Society*. v. 57, n. 3, p. 212-219, 2013.

75. SHUKLA, R., CHANDA, N.; ZAMBRE, A.; UPENDRAN, A.; KATTI, K.; KULKARNI, R.R.; NUNE, S.K. et al. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 109, n. 31, p. 12426-12431, 2012.

76. BELLONI, J. Nucleation, Growth and Properties of Nanoclusters Studied by Radiation Chemistry: Application to Catalysis. *Catal. Today.* v. 113, p. 141-156, 2006.

77. ABEDINI, A.; DAUD, A.R.; HAMID, M.A.A.; OTHMAN, N.K.; SAION, E. A review on radiation-induced nucleation and growth of colloidal metallic nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* v.8, p. 474, 2013.

78. FREITAS, L.F.; DA CRUZ, C.P.C.; CAVALCANTE, A. K.; BATISTA, J.G.S.; VARCA, G.H.C.; MATHOR, M.B.; LUGÃO, A. B. Comparison between gold nanoparticles synthesized by radiolysis and by EGCG-driven gold reduction. *Radiation Physics and Chemistry*. v. 174, 2020.

79. HER, S.; JAFFRAY, D.A.; ALLEN, C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 109, p. 84-101, 2017.

80. HUSSAIN, A.F. UV-visible Spectrometry Anew Colorimetric Method for the Determination of Levo-Dopa in Pharmaceutical Preparation via Oxidative Coupling Organic Reaction View Project This Project Includes Determination of Element Ions View. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/337674152>. Acesso em: jan. 2020.

81. *UV-Vis Spectrum Week*. Published October 26, 2007. Disponível em: <<u>https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:EM\_Spectrum\_Properties\_edit.svg</u>>. Acesso em: nov. 2019.

82. TITUS, D.; JAMES JEBASEELAN SAMUEL, E.; ROOPAN, S. M. Nanoparticle characterization techniques. In: Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles. *Elsevier*. p. 303-319, 2019.

83. LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer US*. doi:10.1007/978-1-4615-7658-7. 1983.

84. Gandhi K, Sharma R, Sandhu R, Singh N, Dhankhar J. *Centre of Advanced Faculty Training in Dairy Processing.* 2018. Disponível em:
<<u>https://www.researchgate.net/publication/331022012</u>>. Acesso em: fev. 2020.
85. SALOPEK, B.; KRASI, D.; FILIPOVI, S. Measurement and application of Zetapotential. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik.* v. 4, n. 1, 1992.

86. ESKANDARI, M. J.; GOSTARIANI, R.; ASADABAD, M. A. *Transmission Electron Microscopy of Nanomaterials.* Disponível em: <a href="https://www.intechopen.com">www.intechopen.com</a>>. Acesso em: jan. 2020.

87. TREVIZAN, L.C.; NÐBREGA, J.A. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry with Axially Viewed Configuration: An Overview of Applications.* v. 18, 2007.

88. BORZOOEIAN, Z.; TASLIM, M.E.; GHASEMI, O.; REZVANI, S.; BORZOOEIAN, G.; NOURBAKHSH, A. A high precision method for length-based separation of carbon nanotubes using bio-conjugation, SDS-PAGE and silver staining. *PLoS ONE.* v. 13, n. 6, 2018.

# 89. ISO- Internacional Organization for Standardization. Biological Evaluation of Medical — Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. 2009.

90. OECD. "Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 2, 2013.

91. ZHANG, C.; WILLETT, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: An Animal Model for Toxicological Studies. *Current Protocols in Toxicology*. v. 1, n. 1, p. 1.7.1-1.7.18, 2003.

92. H. WILLIAM DETRICH III; MONTE WESTERFIELD; LEONARD I. ZON. *Methods in Cell Biology - The Zebrafish: Disease Models and Chemical Screens.* 3rd Edition, Elsevier, v. 105, 2011.

93. WESTERFIELD M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio).* Eugene, OR: Univ. of Oregon Press, 2007.

94. SPITSBERGEN, J.M.; KENT, M.L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research - Advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology.* Taylor and Francis Ltd. v. 31, p. 62-87, 2003.

95. SCHUBERT, S.; KEDDIG, N.; HANEL, R.; KAMMANN, U. Microinjection into zebrafish embryos (Danio rerio) - a useful tool in aquatic toxicity testing? *Environmental Sciences Europe.* v. 26, n. 1, 2014.

96. H. LEE, P.K,S,R.; HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. *Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays.* Dow Chemical Co. v. 12, 1977.

97. CHAKRABORTY, S.; JOSHI, P.; SHANKER, V.; ANSARI, Z.A.; SINGH, S.P.; CHAKRABARTI, P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir.* v. 27, n. 12, p. 7722-7731, 2011.

98. JOKAR, S.; POURJAVADI, A.; ADELI, M. Albumin-graphene oxide conjugates; Carriers for anticancer drugs. *RSC Advances.* v. 4, n. 62, p. 33001–33006, 2014.

99. FLORES, C. Y.; ACHILLI, E.; GRASSELLI, M. Radiosynthesis of Gold/Albumin Core/shell Nanoparticles for Biomedical Applications. *MRS Advances.* v. 2, p. 2675-2681, 2017.

100. GARCIA-CASTINEIRAS, S.; DILLON ASD, J.; SPECTOR, A. Non-tryptophan Fluorescence Associated with Human Lens Protein; Apparent Complexity and Isolation of Bityrosine and Anthranilic Acid. *Experimental Eye Research.* v. 26, n. 4, p. 461-476, 1978.

101. QUEIROZ, R.G.; VARCA, G.H.C.; KADLUBOWSKI, S.; ULANSKI, P.; LUGÃO, A.B. Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-controlled BSA nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 85, p. 82-91, 2016.

102. XIA Q; LI H; XIAO K. Factors Affecting the Pharmacokinetics, Biodistribution and Toxicity of Gold Nanoparticles in Drug Delivery. *Curr Drug Metab.* v. 17, n. 9, p. 849-861, 2016.

103. HAO, G.; XU, Z.P.; LI, L. Manipulating extracellular tumour pH: An effective target for cancer therapy. *RSC Advances.* v. 8, n. 39, p. 22182-22192, 2018.

104. BEURTON, J.; LAVALLE, P.; PALLOTTA, A.; CHAIGNEAU, T.; CLAROT, I.; BOUDIER, A. Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: Effect of charge and binding energy. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 580, 2020.

105. FLORES, C.Y.; ACHILLI, E.; GRASSELLI, M. Radiation-induced preparation of core/shell gold/albumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry.* v. 142, p. 60-64, 2018.

106. BOLAÑOS, K.; KOGAN, M. J.; ARAYA, E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties. *International Journal of Nanomedicine*. v. 14, p. 6387-6406, 2019

107. HALLARE, A.V.; SCHIRLING, M.; LUCKENBACH, T.; KÖHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (Danio rerio) embryos. *Journal of Thermal Biology.* v. 30, n. 1, p. 7-17, 2005. 108. JEZIERSKA, B.; KATARZYNA, Ł.; MAŁGORZATA, W. The Effects of Heavy Metals on Embryonic Development of Fish (a Review). *Fish Physiology and Biochemistry*. v. 35, n. 4, p. 625-640, 2009.

109. BRAUNBECK, T.; BRITTA, K.; EVA, L.; JENS, O.; KATHARINA, S.; DANIEL S.; RUBEN, S. The Fish Embryo Test (FET): Origin, Applications, and Future. *Environmental Science and Pollution Research.* v. 22, n. 21, p. 16247–16261, 2014.

110. DAVE, G.; XIU, R.Q. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, Brachydanio rerio. *Arch Environ Contam Toxicol.* v. 21, n. 1, p. 126-134, 1991.

111. BAI, W.; TIAN, W.; ZHANG, Z.; HE, X.; MA, Y.; LIU, N.; CHAI, Z. Effects of copper nanoparticles on the development of zebrafish embryos. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* v. 10, n. 12, p. 8670-8676, 2010.

112. BAR-ILAN, O.; ALBRECHT, R.M.; FAKO, V.E.; FURGESON, D.Y. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small.* v. 5, n. 16, p. 1897-1910, 2009.

113. MULLER, E.B.; LIN, S.; NISBET, R.M. Quantitative Adverse Outcome Pathway Analysis of Hatching in Zebrafish with CuO Nanoparticles. *Environmental Science and Technology*. v. 49, n. 19, p. 11817-11824, 2015.

114. DE ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; DE GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicology and Teratology.* v. 34, n. 6, p. 545-553, 2012.

115. KIM, K.-T.; TANGUAY, R.L. The role of chorion on toxicity of silver nanoparticles in the embryonic zebrafish assay. *Environmental Health and Toxicology*. v. 29, p. e2014021, 2014.

116. NUNE, S.K.; CHANDA, N.; SHUKLA, R.; KATTI, K.; KULKARNI, R.R.; THILAKAVATHI, S.; MEKAPOTHULA, S.; KANNAN, R.; KATTI, K.V. Green nanotechnology from tea: Phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. v. 19, n. 19, p. 2912-2920, 2009. 117. TOKIN, C.A.; COPE, F.O.; METZ, W.L.; BLUE, M.S.; POTTER, B.M.; ABBRUZZESE, B.C.; HARTMAN, R.D.; JOY, M.T.; KING, D.W.; CHRISTMAN, L.A.; VERA, D.R.; WALLACE, A.M. The efficacy of Tilmanocept in sentinel lymph mode mapping and identification in breast cancer patients: a comparative review and meta-analysis of the <sup>99</sup>mTc-labeled nanocolloid human serum albumin standard of care. *Clin Exp Metastasis.* v. 29, n. 7, p. 681-686, 2012.

118. TSAI, D.H.; DELRIO, F.W.; KEENE, A.M.; TYNER, K.M.; MACCUSPIE, R.I.; CHO, T.J.; ZACHARIAH, M.R.; HACKLEY, V.A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir.* v. 27, n. 6, p. 2464-2477, 2011.

119. NEUMANN, E.; FREI, E.; FUNK, D.; BECKER, M.D.; SCHRENK, H.H.; MÜLLER-LADNER, U.; FIEHN, C. Native albumin for targeted drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* v. 7, n. 8, p. 915-925, 2010.

120. SLEEP D. Albumin and its application in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* v. 12, n. 5, p. 793-812, 2015.

## Materiais e Reagentes

✓ Tetracloroaurato de Sódio (III) Di-hidratado

Fórmula linear: NaAuCl<sub>4</sub> – 2 H<sub>2</sub>O

Peso molecular: 397,8 g/mol

CAS-No.: 13874-02-7

Sinônimos: sodium gold chloride





✓ Cloreto de Ouro (III) Hidratado

Fórmula linear: HAuCl<sub>4</sub> – 3 H<sub>2</sub>O

Peso molecular: 393,83 g/mol

CAS-No.: 16961-25-4

**Sinônimos:** tetrachloroauric (III) acid hydrogen tetrachloroaurate (III)

# ✓ Epigalocatequina-3-galato- EGCG 80% e 95%

Fórmula linear: C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>

Peso molecular: 458,37 g/mol

CAS-No.: 989-51-5

**Sinônimos:** EGCG, (-)-cis-3,3',4',5,5',7-Hexahydroxy-flavane-3-gallate, (-)-cis-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate



✓ Mangiferina - Mangifera indica

Fórmula linear: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>

Peso molecular: 422,34 g/mol

CAS-No.: 4773-96-0

**Sinônimos:** 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthone C2-β-Dglucoside



## ✓ Citrato de Sódio

Fórmula linear: HOC(COONa)(CH<sub>2</sub>COONa)<sub>2</sub> – 2 H<sub>2</sub>O

Peso molecular: 294,10 g/mol

CAS-No.: 6132-04-3

Sinônimos: - Citrato Trissódico



Fórmula linear: HNO3

Peso molecular: 63,01 g/mol

CAS-No.: 7697-37-2



✓ Fosfato de Potássio Monobásico

Fórmula linear: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Peso molecular: 136,09 g/mol

CAS-No.: 7778-77-0

**Sinônimos:** Fosfato de potássio, Dihidrogenofosfato de potássio, Fosfato monopotássico.





Fórmula linear: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Peso molecular: 119,98 g/mol

CAS-No.: 7558-80-7

**Sinônimos:** Di-hidrogeno-ortofosfato monossódico, fosfato monossódico, dihidrogenofosfato de sódio.

✓ Fosfato de Sódio Bibásico

Fórmula linear: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Peso molecular: 141,96 g/mol

CAS-No.: 7558-79-4

**Sinônimos:** *sec*-Sodium phosphate, Hidrogenofosfato dissódico, Fosfato dissódico, Hidrogenofosfato de sódio, Fosfato de sódio dibásico.

✓ Ácido Ascórbico

Fórmula linear: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>

Peso molecular: 176,12 g/mol

CAS-No.: 50-81-7

**Sinônimos:** Ácido L-Ascórbico, Ácido L-Treoascórbico, Fator antiescorbútico, Vitamina C

✓ Cloreto de Sódio

Fórmula linear: NaCl

Peso molecular: 58,44 g/mol

CAS-No.: 7647-14-5

Sinônimos: Halite, Sodium chloride



 $Na \cdot \rightarrow \cdot$ 

HO<sup><sup>I</sup></sup> P O<sup>-</sup> Na<sup>+</sup>



116

Fórmula linear: NaBH4

Peso molecular: 37,83 g/mol

CAS-No.: 16940-66-2

**Sinônimos:** Boro Hidreto de Sódio, Sodium borohydride, Sodium tetrahydridoborate.

# ✓ Albumina do Soro Humano - Human Serum Albumin

Lyophilized powder, ≥97% (agarose gel electrophoresis)

CAS-No.: 70024-90-7

Sinônimos: HAS, ASH

# ✓ Albumina do Soro Bovino - Bovine Serum Albumin

Heat shock fraction, pH 7, ≥98%

CAS-No.: 9048-46-8

Sinônimos: BSA, Bovine Albumin

✓ Tartarato de Sódio e Potássio

Fórmula linear: KNaC4H4O6.4H2O

Peso molecular: 282,22 g/mol

CAS-No.: 6381-59-5

Sinônimos: Tartarato duplo de sódio e potássio







✓ Carbonato de Sódio P.A.

Fórmula linear: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Peso molecular: 105,99 g/mol

CAS-No.: 497-19-8

0 Na<sup>+</sup> C Na<sup>+</sup> 0 0<sup>-</sup>

**Sinônimos:** Soda calcinada, sal dissódico de ácido carbônico, carbonato de sódio.

#### Equipamentos

#### ✓ Molecular Devices® SpectraMax® i3

O leitor de microplacas multimodo SpectraMax® i3x mede absorbância, a fluorescência e a luminescência.

Faz análise de viabilidade celular, como imagens de confluência celular e viabilidade, análise de Western blot e quantificação de ácidos nucleicos e proteínas e, também, de segmentação de células, medição de confluência e contagem de células.

Além disto, permite análises rápidas de alterações fenotípicas que acompanham a citotoxicidade, proliferação celular e expressão de proteínas.



✓ Thermo Fisher Scientific® Microcentrífuga Heraeus ™ Fresco ™ 21

Este equipamento faz processamento rápido de amostras por meio da separação por microvolume. Tem aceleração de até 21.000xg em menos de 12 segundos, refrigeração e capacidade para 24 tubos de 1,5 a 2,0 mL a minipreparações e colunas de rotação.



## ✓ Thermo Fisher Scientific® UltiMate 3000 HPLC and UHPLC Systems

Sistema oferece métodos à análise de rotina, com recursos de HPLC a UHPLC, desempenho cromatográfico, além de múltiplas opções de detectores, como: detector de aerossol carregado, matriz de diodos, eletroquímico, fluorescência, comprimento de onda múltiplo, índice de refração, comprimento de onda variável e detecção por espectrometria de massa. Atua por pressão do sistema, precisão do tempo de retenção, faixa de fluxo e baixa dispersão e alto rendimento.



## ✓ HITACHI® F-4500 Fluorescence Spectrophotometer

A aplicação da fluorofotometria foi expandida para vários campos, como materiais industriais, em áreas como eletroluminescência orgânica e cristais líquidos; áreas relacionadas ao meio ambiente, como análise da qualidade da água; fabricação farmacêutica, como a síntese e desenvolvimento de um reagente de fluorescência; e para áreas relacionadas à biotecnologia, como medição da concentração intracelular de cálcio.



#### ✓ CytoViva® Hyperspectral Microscopy

Desenvolvido para caracterização espectral e mapeamento espectral de amostras em nanoescala fotografadas com microscópio de campo escuro à base de campo escuro. Esta tecnologia de imagem hiperespectral suporta micro e macro em escala.

Cada pixel de uma imagem hiperespectral fornece a resposta espectral de refletância completa da área espacial desse pixel dentro da faixa espectral VNIR ou SWIR. Isso permite medições espectrais não destrutivas de elementos em nanoescala no contexto espacial completo da imagem da amostra.

Com ampliação de 100x, uma imagem de microscópio hiperespectral pode conter até 700.000 pixels, cada um com 128 nm cada.

Imagens microscópicas hiperespectrais podem ser capturadas de amostras em nanoescala biológicas e baseadas em materiais. Esses materiais em nanoescala podem ser integrados em uma ampla gama de ambientes biológicos ou baseados em materiais.

Os componentes para o sistema de imagem hiperespectral baseado em microscopia incluem uma fonte de luz especializada, estágio de tradução automatizado, espectrógrafo de grade de difração de transmissão e câmera.

A imagem hiperespectral pode ser adquirida nas faixas visíveis de infravermelho próximo (VNIR 400 nm - 1.000 nm), bem como nas faixas de comprimento de onda infravermelho de onda curta (SWIR 900 nm - 1.700 nm).



### ✓ Microscópio Eletrônico de Transmissão TECNAI G2-20

O MET Tecnai G2-20 é um microscópio analítico que permite trabalhos com diferentes tensões, sendo de 80 a 200kV.

Seu canhão de elétrons é de emissão termiônica, ou seja, aumento do fluxo de elétrons que saem de um metal, devido ao aumento de temperatura. Ele utiliza um cristal LaB<sub>6</sub> como fonte de elétrons.

O microscópio tem coeficiente de aberração esférica Cs = 2.0, resolução de linha de 0.24 nm, e resolução de ponto de 0.10 nm. A faixa de magnificação nominal para imagens é de 340X a 1,050,000X.

É equipado com detectores de EDS (espectrômetro de raio-X por dispersão em energia) de Si(Li), com janela de 30 mm<sup>2</sup> (EDAX), e um filtro de energia Gatan Image Filter (GIF) - Sistema Quantum SE que permite obtenção de imagem filtrada em energia e espectros de perda energia de elétrons (EELS).

O Sistema Quantum SE é equipado com detector DigiScan anular de campo escuro (ADF) e campo claro para modo de varredura (STEM), e três câmeras CCD Erlangshen ES500W (1350x1040 pixels), Orius SC200 (2048x2048 pixels) e US1000XP/FT (2048x2048 pixels).



## ✓ GEHAKA® Balança Analítica AG200

A Balança Analítica AG200 possui sistema de calibração interna que garante precisão e facilidade de uso para o operador, possibilitando ajustar sempre que necessário.

O gabinete foi construído em chapa de aço com pintura em epóxi que garante a alta resistência ao ataque de produtos químicos. Tem excelente blindagem magnética, evitando alterações por influências exteriores. Protetor de vento standard, com três portas, que oferece maior segurança e estabilidade nas pesagens. Fonte de alimentação chaveada de alto desempenho, que permite a utilização em qualquer tensão de rede elétrica entre 90 e 240 VAC, sem a necessidade de acionar tecla de seleção de voltagem. Display LCD de fácil leitura, com caracteres especiais: %, g e PCS;

A AG200 possui cinco funções que facilitam o seu uso:

- Porcentagem: efetua cálculos percentuais diretamente;
- Contagem: contagem de peças a partir de uma amostra;
- Formulação: totaliza uma fórmula;
- Estabilidade: permite que o usuário selecione uma das três condições de uso da balança garantindo o seu melhor desempenho em condições adversas do ambiente;
- ZeroTrack: garante o retorno ao zero da balança, dispensando o operador de zerá-la várias vezes.



### ✓ FISATOM® Agitador Magnético com Aquecimento 753A

Agita até 10L, formando vórtex, Ø da placa de 18cm, faixa de rotação (r/min.) de 100 a 1.800, potência de 1.100W, controle de temperatura da placa de 50 a 360°C por termostato, barras magnéticas Ø x comp. (mm) de 9x15, 11x37 e 11x52 e grau de proteção IP23.



### ✓ Glow Discharge

A descarga de brilho é um tipo de plasma que é gerado quando a tensão DC é aplicada aos dois eletrodos dentro de um tubo de vidro contendo gás precursor na faixa de pressão de 0,1 a 10Torr.

Formado pela passagem de uma corrente de 100 V a vários kV através de um gás, geralmente argônio ou outro gás nobre. É encontrado em produtos como luzes fluorescentes e televisores de tela de plasma, e é usado na física de plasma e na química analítica.

A célula é normalmente preenchida com argônio. Um potencial de várias centenas de volts é aplicado entre os dois eletrodos. Uma pequena população de átomos dentro da célula é ionizada inicialmente por processos aleatórios. Os íons são direcionados em direção ao cátodo pelo potencial elétrico, e os elétrons são direcionados em direção ao ânodo pelo mesmo potencial. A população inicial de íons e elétrons colidem com outros átomos, ionizando-os. Enquanto o potencial for mantido, uma população de íons e elétrons permanece.



A figura acima mostra as principais regiões que podem estar presentes em uma descarga de brilho.



Nesta figura, temos um gráfico V / I típico de uma descarga de brilho. As principais características da descarga, como a tensão de ruptura, a característica da corrente de tensão e a estrutura da descarga, dependem da geometria dos eletrodos, do gás utilizado, da pressão e do material do eletrodo.

Podem ser feitos dois tipos de descarga:

- Descarga escura: onde o regime entre A e E na característica tensãocorrente é denominado descarga escura porque, exceto nas descargas de coroa e na própria ruptura, a descarga permanece invisível aos olhos.
- Descarga de brilho: na qual o regime de descarga de brilho deve seu nome ao fato de o plasma ser luminoso. O gás brilha porque a energia eletrônica e a densidade numérica são altas o suficiente para gerar luz visível por colisões de excitação. As aplicações da descarga de brilho incluem luzes fluorescentes, reatores de plasma de placa paralela dc, descargas de "magnetron" usadas para depositar filmes finos e fontes de plasma com eletrobombardismo.



#### ✓ DLS Zetasizer ZS – Titulometria

Utilizado para a medição do tamanho, da mobilidade eletroforética de proteínas, do potencial Zeta de soluções coloidais e nanopartículas, com a opção de medição da mobilidade de proteínas e micro reologia de soluções de proteínas e polímeros.

O alto desempenho do Zetasizer Nano ZS permite também a medição da massa molecular e do segundo coeficiente virial, A2, de macromoléculas e kD, o parâmetro de interação de DLS.

O sistema pode também ser utilizado em configuração de fluxo para operar como detector de tamanho de SEC ou FFF.

É um analisador de alto desempenho, com dois ângulos, para tamanho molecular e de partículas. Melhor detecção de agregados e medição de amostras pequenas ou diluídas, bem como de amostras com concentrações extremas (alta ou baixa) usando espalhamento de luz dinâmico com óptica "NIBS". O ZSP também contém um analisador de potencial Zeta, que utiliza o espalhamento de luz eletroforética para partículas, moléculas e superfícies, e um analisador de massa molecular por espalhamento da luz estática.

Usando a óptica NIBS (Non-Invasive Backscatter), seu desempenho é significativamente melhor em comparação aos sistemas que utilizam espalhamento em ângulo de 90°.

A opção de modo de fluxo permite que o sistema seja conectado a um sistema SEC ou FFF, o qual pode ser usado como detector do tamanho das proteínas ou nanopartículas



## Produção acadêmica durante o período de doutoramento: 2016-2020

### ✓ Artigos em periódicos

- MAZIERO, JOANA S.; THIPE, VELAPHI C.; ROGERO, SIZUE O.; CAVALCANTE, ADRIANA K.; DAMASCENO, KELME C.; ORMENIO, MATHEUS B.; MARTINI, GISELA A.; BATISTA, JORGE G.S.; VIVEIROS, WILLIAM.; KATTI, KAVITA K.; RAPHAEL KARIKACHERY, ALICE; DHURVAS MOHANDOSS, DARSHAKUMAR; DHURVAS, RASHMI DARSHAKUMAR; NAPPINNAI, MOHANAVELU; ROGERO, JOSÉ R.; LUGÃO, ADEMAR B.; KATTI, KATTESH V. Species-Specific in vitro and in vivo Evaluation of Toxicity of Silver Nanoparticles Stabilized with Gum Arabic Protein. International Journal of Nanomedicine, v. 15, p. 7359-7376, 2020.
- LUCAS F. DE FREITAS; CASSIA P. C. DA CRUZ; ADRIANA K. CAVALCANTE; JORGE G. DOS SANTOS BATISTA; GUSTAVO H. C. VARCA; MONICA BEATRIZ MATHOR; ADEMAR B. LUGÃO. Comparison between gold nanoparticles synthesized by radiolysis and by EGCG-driven gold reduction. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 174, 2020.
- DE FREITAS, L. F.; VARCA, G. H. C.; BATISTA, J. G. S.; LUGÃO, A. B. An overview of the synthesis of gold nanoparticles using radiation technologies. *Nanomaterials*, v.8, n. 11, p.939, 2018.

### ✓ Patente depositada

 FREITAS DE FREITAS, LUCAS; VARCA, GUSTAVO; BATISTA, J. G. S.; BENÉVOLO LUGÃO, ADEMAR. "Processo de síntese e esterilização simultânea de nanopartículas híbridas". Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202000293, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil. Depósito: 11/02/2020

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000 Fone/Fax(0XX11) 3133-8908 SÃO PAULO – São Paulo – Brasil http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.