



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ATIVO COM
ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA FINS BIOMÉDICOS**

Jéssica Leal Ogata

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

**São Paulo
2017**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ATIVO COM
ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA FINS BIOMÉDICOS**

Jéssica Leal Ogata

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

**São Paulo
2017**

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:

LEAL OGATA, J. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ATIVO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA FINS BIOMÉDICOS**. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (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).

Leal Ogata, Jéssica
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ATIVO
COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA FINS BIOMÉDICOS / Jéssica Leal
Ogata; orientador Ademar Benévolo Lugão. -- São Paulo, 2017.
72 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2017.

1. Ouro. 2. Ativo. 3. Síntese. 4. Radioterapia. 5.
Biomédico. I. Benévolo Lugão, Ademar, orient. II. Título.

***À minha mãe e melhor amiga,
que mesmo não tendo as mesmas
oportunidades sempre me incentivou,
acreditou em meu sucesso e em muitas
vezes, abriu mão de seu próprio
conforto pelo meu.***

“A coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo”

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Ademar Benévolo Lugão pela orientação, dedicação e principalmente por acreditar em meu trabalho e me conceder esta oportunidade.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Federico Genezini pela prontidão e auxílio em todas as dúvidas relacionadas à utilização do reator nuclear.

Ao Dr. Kattesh V. Katti por disponibilizar as dependências da Universidade do Missouri para diversas análises, e por toda ajuda prestada com a interpretação dos resultados.

Ao Dr. Koiti Araki pela disponibilização dos equipamentos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Ao Dr. Mariano Grasselli por ser sempre muito solícito e disposto a ajudar e sanar as dúvidas relacionadas ao uso de albumina sérica, e por ter auxiliado grandemente no início deste projeto.

Ao Dr. Jonnatan Santos por seu constante incentivo, sua persistência e por acreditar em minha capacidade, sua ajuda e seus ensinamentos foram essenciais e sou muito grata por isso.

À professora Dra. Nilce Ortiz e à Dra. Marycel pela colaboração e disponibilização de seus laboratórios e equipamentos.

Ao Dr. Luis Alberto do Centro de Radiofarmácia do IPEN, por sua

pronta disponibilidade, acompanhamento e ajuda em todos os processos relacionados à parte radioativa deste estudo.

Ao meu senhor e salvador Jesus Cristo por me conceder forças e perseverança em busca dos meus sonhos, nunca me deixar desanimar, e ser uma fonte de justiça em todas as ocasiões.

À minha família pelo apoio e palavras de incentivo que tornaram esta caminhada mais suave, sem vocês eu não chegaria até aqui.

Ao meu namorado Flávio Ogata por ser mais do que meu companheiro, por ser meu amigo, e fazer o possível pra me ver feliz e me ajudar em tudo.

Ao meu grande amigo e irmão Vinicius Carvalho, por me apresentar ao IPEN e estar sempre ao meu lado em minhas decisões.

Aos meus amigos do IPEN que tornaram essa caminhada muito mais divertida, Cristina Angioletto, Henrique Ferreira, Maria José, Giovanni Morselli, Mara Mello, Jorge Gabriel, Mara Alcântara, Jonnatan Santos, Tiago Maia, Mayeli Strada, Lina Baddia, Derly Dias, Pedro Castro e Adriana Gerardes, saibam que vocês foram um porto seguro para mim nesses anos.

Aos meus filhos, não de sangue, mas de alma, vocês são a força que me mantém, obrigada por existirem.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ATIVO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA FINS BIOMÉDICOS

Jéssica Leal

RESUMO

O uso de nanopartículas na medicina já faz parte de nossas vidas, embora as nanopartículas de ouro não sejam oficialmente usadas em medicina, o uso de ouro coloidal ou sais de ouro para o tratamento de doenças como a sífilis, a artrite ou até a dipsomania são conhecidos desde o século XIX. Nesta dissertação, foi desenvolvido um método capaz de gerar nanopartículas de ouro, modificado com albumina de soro bovino, a partir de ouro 198, para um possível uso como método alternativo para o tratamento e diagnóstico de câncer. A síntese, adaptada do método publicado por Turkevich em 1951, gera nanopartículas utilizando uma folha de ouro de alta pureza (em vez de um sal), o que permite a geração de um material com alta pureza radioquímica, não sendo observadas impurezas radioativas indesejáveis. As amostras preparadas foram caracterizadas por diferentes técnicas para determinação de suas características físico-químicas, através de espectroscopia UV-Visível foi possível observar a banda de ressonância de plasmon de superfície a 520 nm, por microscopia eletrônica de transmissão um raio hidrodinâmico em torno de 14 nm foi observado, sendo medida por espalhamento de luz dinâmico a suspensão apresentou um raio de 30 nm e após a modificação de BSA o aumento deste tamanho para 50 nm. Os resultados de potencial Zeta indicam nanopartículas muito estáveis com potencial próximo a -40mV, e por espectroscopia de fluorescência é possível observar como a proteína é afetada pela radiação.

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ATIVO COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA PARA FINS BIOMÉDICOS

Jéssica Leal

ABSTRACT

The use of nanoparticles in medicine is already part of our lives, although gold nanoparticles are not officially used in medicine, the use of colloidal gold or salts of gold to treatment diseases such as syphilis, arthritis or even dipsomania are known since the 19th century. In this dissertation, a method capable of generating gold nanoparticles, modified with bovine serum albumin, was developed from gold 198, for a possible use as an alternative method for the treatment and diagnosis of cancer. The synthesis, adapted from the method published by Turkevich in 1951, generates nanoparticles utilizing a gold leaf with high purity (instead of a salt), what allows the generation of a material with high radiochemical purity, does not being observed undesirable radioactive impurities. The samples prepared were characterized by different techniques, by UV-Visible spectroscopy was possible to observe the surface plasmon resonance band at 520nm, by transmission electron microscopy a size around 14nm was observed, being measured by dynamic light scattering the suspension presented a size of 30 nm and after the modification of BSA the increase of this size to 50 nm. Zeta potential results indicate very stable nanoparticles with a potential close to -40mV, and by fluorescence spectroscopy is possible to observe how the protein is affected by radiation.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	16
2.1. Objetivos gerais	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	18
3.1. Nanopartículas de ouro	18
3.2. O efeito de ressonância de plasmon de superfície	20
3.3. Albumina Sérica Bovina	22
3.4. Métodos de obtenção de nanopartículas de ouro	26
3.5. O uso de nanopartículas de ouro na medicina	28
3.6. Radiação nuclear e radiação gama aplicada à nanopartículas de ouro	30
3.6.1. Radiação nuclear	30
3.6.2. Radiação gama	33
4. PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1. Reagentes	35
4.2. Caracterizações	36
4.3. Procedimentos experimentais	36
4.3.1. Síntese de nanopartículas de ouro (^{197}Au)	36
4.3.2. Modificação com BSA	37
4.3.3. Modificação com raios gama	37
4.3.4. Síntese de nanopartículas com ouro ativo (^{198}Au)	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Síntese de Nanopartículas de ^{197}Au	39

5.2. Modificação das nanopartículas de ^{198}Au com radiação gama	48
5.3. Síntese de nanopartículas de ^{198}Au	52
6. CONCLUSÃO	61
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Determinação das concentrações de BSA inseridas nas amostras.	.44
TABELA 2: Resultados de potencial Zeta das amostras A-1, A-4 e A-7 respectivamente.....	48
TABELA 3: Dose de radiação gama aplicada e classificação das amostras respectivamente.....	49
TABELA 4: Classificação e composição das amostras sintetizadas com ^{198}Au	53
TABELA 5: Resultados de cromatografia com fitas de papel Whatman e fitas de ITLC-SG, expressando a porcentagem de pureza radioquímica em cada amostra.	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Processos ópticos importantes resultantes da absorção de luz em uma nanopartícula de ouro. Dispersão de Mie, Fluorescência e espalhamento Raman de moléculas adsorvidas.....	21
FIGURA 2: Estrutura molecular da albumina sérica bovina	23
FIGURA 3: Conformações estruturais de cadeias polipeptídicas. a) Estrutura primária; b) Estrutura secundária; c) Estrutura terciária; d) Estrutura quaternária.....	24
FIGURA 4: Estrutura molecular do Citrato de Sódio	27
FIGURA 5: Ilustração mostrando a ligação do citrato de sódio à superfície das nanopartículas de ouro.....	27
FIGURA 6: Esquema de decaimento do ^{198}Au	33
FIGURA 7: Folha de ouro utilizada para dissolução e posterior síntese de nanopartículas.....	39
FIGURA 8: Equipamentos e esquema montado para evaporação de ácidos evitando a contaminação da bomba de vácuo	40
FIGURA 9: Solução de nanopartículas de ouro, após a realização de redução química.	40
FIGURA 10: Espectro de extinção UV-Vis das AuNps após redução química por citrato de sódio. ($\lambda_{\text{máx}}= 522 \text{ nm}$)	41
FIGURA 11: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AuNps em aproximação de 200 nm.....	42
FIGURA 12: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AuNps com aproximação de 20 nm e cálculo do raio hidrodinâmico da partícula em torno de 13,8 nm.....	42
FIGURA 13: Espectros de extinção da suspensão de AuNps (preto) e AuNps acrescidas do ácido 3mercaptopropiônico (vermelho).....	43
FIGURA 14: Comparativo obtido em DLS entre amostras com concentração de 0,25 mg/ml de BSA, com o agente de acoplamento EDC/NHS e sem EDC/NHS respectivamente	45
FIGURA 15: Espectro de extinção UV-Visível das amostras A-0 à A-8 sintetizadas com ^{197}Au . Evidenciando o deslocamento de banda e modificação na superfície das nanopartículas.	46

FIGURA 16: Medida de espalhamento dinâmico de luz das amostras A-0 à A-8 e dados da concentração de BSA em cada amostra, evidenciando a relação entre raio hidrodinâmico e concentração de BSA	47
FIGURA 17: Espectros de fluorescência de uma solução padrão de BSA comparada a uma amostra de AuNp+BSA. Análise realizada em excitação de 270 nm e emissão em 290 à 520 nm	50
FIGURA 18: Espectros de fluorescência das amostras G-0 à G-7. Análise realizada em excitação de 270 nm e emissão em 290 à 520 nm. Evidenciando a presença de resíduos triptofano característicos da BSA.....	51
FIGURA 19: Espectro gama da amostra de ouro com pico em 411 keV, inserido folha de ouro e esquema de decaimento do ^{198}Au	53
FIGURA 20: Análise cromatográfica em papel com as fitas Whatman e ITLC-SG respectivamente	54
FIGURA 21: Amostras sintetizadas com 100% de ^{198}Au (A e B-198) e amostras sintetizadas com 20% de ^{198}Au (A e B-197/198).....	55
FIGURA 22: Espectros de extinção em UV-Vis das amostras 198-A e 198-B com deslocamento da banda de 524 nm para 528 nm	56
FIGURA 23: Espectros de extinção em UV-Vis das amostras 197/198-A e 197/198-B com deslocamento da banda de 523 nm para 528 nm.....	57
FIGURA 24: Análise comparativa obtida em DLS das amostras A-0 e A-4 sintetizadas com ^{197}Au , amostras 198-A e 198-B sintetizadas com 100% de ^{198}Au e amostras 197/198-A e 197/198-B sintetizadas com 20% de ^{198}Au	58
FIGURA 25: Espectros em UV-Vis das amostras 197/198-B e 198-B, apresentando banda característica de BSA em torno de 280 nm e banda de ressonância de plasmon de AuNps em torno de 530 nm	59
FIGURA 26: Espectros de fluorescência das amostras B-197/198 e B-198. Análise realizada em excitação de 270 nm e emissão em 290 à 520 nm. Evidenciando a diminuição de emissão dos resíduos triptofano característicos da BSA na amostra sintetizada com 100% de ^{198}Au	60

1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica e indústrias farmacêuticas têm demonstrado um crescente interesse na nanociência, parte deste interesse é atribuída às possíveis mudanças nas propriedades dos materiais quando reduzidos a escala nanométrica, ou às intrínsecas propriedades ópticas, eletrônicas, magnéticas e catalíticas das nanopartículas, mas também às inúmeras aplicações destes sistemas, como construção de sensores, microeletrônica, transporte de drogas para moléculas específicas e no tratamento e diagnóstico precoce de doenças como o câncer. (OKUYAMA, LENGGORO e IWAKI, 2004; PARVEEN, MISRA e SAHOO, 2012)

O uso de nanopartículas na terapêutica do câncer é atraente por diversas razões, entre elas, propriedades farmacocinéticas únicas, filtração renal mínima, presença de um núcleo essencialmente inerte e não tóxico. Além disso, possuem alta superfície de contato permitindo a modificação de sua superfície, geralmente por meio de ligações com grupos tiol, essa afinidade combinada à agentes de direcionamento ou quimioterápicos específicos permite a modificação das nanopartículas com relativa facilidade, e por meio de um projeto inteligente é possível a obtenção de nanopartículas multifuncionais que poderiam aumentar a eficiência da detecção, diagnóstico e terapia de tumores. (GHOSH, HAN, *et al.*, 2008; BHATTACHARYYA, KUGDUS, *et al.*, 2011)

Os tratamentos de Radioterapia são empregados em larga escala para quase todos os tipos de tumores sólidos existentes. Infelizmente, as radiações ionizantes atingem todas as células sem discriminação, assim, o dano tecidual ainda é um fator que limita a dose de radiação aplicada e assim diminui a erradicação de células tumorais durante a radioterapia.

A aplicação de nanopartículas que atinjam especificamente o tumor tem como objetivo melhorar os resultados da radioterapia induzindo um aumento da toxicidade para as células tumorais e menor toxicidade para as células normais. (MESBAHI, 2010)

Estudos demonstram que proteínas do sangue são capazes de se acumular em tecidos tumorais. (KRATZ e BEYER, 1998) A albumina de soro bovino (BSA) que trabalha no transporte de moléculas hidrofóbicas no corpo é amplamente utilizada para o carregamento de drogas por causa de sua importância médica, abundância, baixo custo, facilidade de purificação e sua ampla aceitação na indústria farmacêutica. (ELZOGHBY, SAMY e ELGINDY, 2012)

Sistemas carreadores de fármacos permitiriam a racionalização da terapia medicamentosa. (LEE e WANG, 2006) Nanopartículas magnéticas conjugadas a biomoléculas podem ser utilizadas para tratamentos antitumorais de hipertermia a laser localizado. A acumulação de BSA em tecidos tumorais, junto com a ação fototérmica aplicada ao ouro poderia produzir a necrose seletiva de células malignas. (RAHMAN, BISHARA, *et al.*, 2009; LANCU, 2013)

A proposta deste trabalho é apresentar a síntese de nanopartícula de ouro e sua conjugação com albumina sérica bovina de forma que possam desempenhar um papel significativo no avanço de diagnósticos clínicos, na nanomedicina e em futuras aplicações terapêuticas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos gerais

Tendo em vista as possíveis aplicações de nanopartículas de ouro em biomedicina e a necessidade do desenvolvimento de novos materiais, cada vez mais efetivos e seletivos para o tratamento de câncer, este trabalho tem como propostas a síntese e a caracterização de nanopartículas de ouro a partir de ouro em forma de folha (macroscópico) com alta pureza química e radioquímica, utilizando um método simples e reprodutível. Para tal, nanopartículas de ouro foram produzidas a partir da oxidação da folha de ouro e posterior redução utilizando citrato de sódio e conjugadas à albumina sérica bovina. O BSA foi conjugado à nanopartícula de ouro tendo em vista sua seletividade para células cancerígenas e nesse trabalho se estudou sua utilização como sonda para verificar os efeitos da radiação.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese de nanopartículas de ouro com distribuição monodispersa de tamanho e alto rendimento sintético;
- Caracterização do tamanho destas nanopartículas de ouro por microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico;
- Modificação das nanopartículas de ouro com albumina sérica bovina a partir do acoplamento da biomolécula com a nanopartícula de ouro utilizando o ácido 3-mercaptopropiônico como ligante;
- Acompanhamento da modificação das nanopartículas de ouro com albumina sérica bovina por espectroscopia eletrônica e espalhamento de

luz dinâmico;

- Observar os efeitos da radiação gama sobre biomoléculas, expondo as nanopartículas de ouro modificadas com albumina sérica bovina a diversas doses de radiação.
- Caracterizar essas alterações por espectroscopia de fluorescência;
- Sintetizar nanopartículas de ouro utilizando ^{198}Au modificadas com albumina sérica bovina e, após o decaimento, caracterizar-las por espectroscopia eletrônica e espalhamento de luz dinâmico;
- Verificar os efeitos da radiação emitida pelas nanopartículas de ouro sobre as biomoléculas modificadoras por espectroscopia de fluorescência.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Nanopartículas de ouro

Ocupando o 79º lugar na tabela periódica, o ouro, pertencente ao grupo onze é um metal de transição que se caracteriza por sua coloração dourada, brilhante, resistente a corrosão, dúctil e maleável. Possui massa atômica de 197u e é encontrado em estado sólido na natureza, os compostos mais comuns formados a partir do ouro são o cloreto áurico (AuCl_3) e ácido cloroáurico (HAuCl_4). É um metal resistente à maioria dos reagentes químicos, sendo sensível a uma mistura de ácido nítrico com ácido clorídrico chamada de água régia.

Nanopartículas de ouro possuem simples preparação, boa estabilidade, propriedades óticas e eletrônicas diferenciadas, controle do tamanho das partículas, além da possibilidade de bioconjugação com outras moléculas, suas propriedades vêm sendo estudadas nos últimos anos devido a características promissoras em tratamentos médicos, entre outros. (BRODY, 2013; WINTER, 2016)

Os primeiros objetos de ouro que se tem notícia foram encontrados em sepulcros na cidade de Varna - Bulgária e são datados de 4600-4200 a.C. (BRODY, 2013) Os relatos primordiais de sistemas com o uso de nanopartículas de ouro datam do século IV a.C em Roma, onde nanopartículas metálicas eram utilizadas para produzir efeitos coloridos em vidros e cerâmicas. Derretendo-se ouro em pó junto com o vidro, as nanopartículas de ouro eram difundidas para o vidro, e estes por sua vez passavam a refratar a luz, dando ao vidro um brilho vermelho luminoso, a cor exata depende da forma do ouro coloidal, como por exemplo, aqueles gerados pela combinação de nanopartículas de ouro e prata que conferem ao famoso cálice de Licurgo a cor esverdeada quando visualizado por reflexão e avermelhada quando observada por transmissão da luz. (FELDHEIM e FOSS JR., 2002)

Considera-se uma partícula nanométrica quando esta apresenta

tamanho inferior a 100 nanômetros (nm), porém para aplicações farmacêuticas essa faixa pode variar até 1000 nm. Por possuir raio hidrodinâmico consideravelmente menor do que o das células humanas, essas nanopartículas podem interagir com biomoléculas, tanto na superfície quanto no interior das células. (FARAJI e WIPF, 2009)

Os mais antigos registros do uso de ouro na medicina vêm da Alexandria - Egito, onde há 5.000 anos os Alquimistas desenvolveram um "elixir", feito de ouro líquido. Acreditavam ser o ouro um metal místico e que sua presença no corpo poderia rejuvenescer, além de curar uma série de doenças.

Os egípcios também já usavam o ouro há aproximadamente 4.500 anos para tratamentos odontológicos, já que não apresenta toxicidade, pode ser facilmente modelado e nunca se desgasta o ouro tornava-se ideal para tais aplicações. (FRICKER, 1996)

Na Roma antiga, pomadas feitas com ouro eram usadas para o tratamento de úlceras na pele, e, na Europa medieval, pílulas revestidas de ouro e "águas de ouro" eram extremamente populares. Alquimistas misturavam ouro em pó nas bebidas, para confortar os afetados por dores nas pernas. O uso do ouro em pó para combater dores causadas pela artrite foi passado através dos séculos e, ainda hoje, é usado no tratamento da artrite reumatóide. (FRICKER, 1996)

Durante a Renascença, o grande alquimista, considerado fundador da medicina moderna, Paracelso, desenvolveu vários medicamentos, altamente bem-sucedidos, partindo de minerais metálicos incluindo o ouro. Após estudar os trabalhos de Paracelso, em 1857 o renomado químico inglês Michel Faraday preparou o ouro coloidal em estado puro, e muitos usos foram encontrados para suas soluções, sua preparação permaneceu estável durante aproximadamente cem anos, sendo destruída apenas no bombardeio de Londres durante a segunda guerra mundial. (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1951; TURKEVICH, 1985)

Em 1890, o conceituado bacteriologista alemão, Robert Koch, obteve o Prêmio Nobel, por ter descoberto que compostos feitos com ouro inibiam o crescimento das bactérias que causavam a tuberculose. Em 1898 Richard Adolf Zsigmondy preparou o primeiro ouro coloidal em solução diluída. (LAYLIN, 1993)

A redução química de ouro iônico (Au^{3+}) em ouro metálico (Au^0) é baseada no método clássico desenvolvido em 1951 por Turkevich em que se

utiliza citrato de sódio como agente de redução. (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1953) Em seu experimento com citrato de sódio, Turkevich realizou a preparação de uma suspensão modificando uma descrição de Hauser e Lynn, (HAUSER e LYNN, 1940) tornando-se então esta, a descrição de uma preparação "padrão". (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1951)

Nas últimas décadas, embora muitas estratégias tenham sido desenvolvidas para preparar nanopartículas de ouro em solventes orgânicos ou aquosos, o método de redução com citrato de sódio permanece apresentando-se satisfatoriamente, visto que, utiliza um redutor barato e não tóxico. (LI, WAN, *et al.*, 2011)

Os íons citrato atuam tanto na redução como na estabilização de nanopartículas de ouro (AuNps), evitando agregação graças à repulsão gerada pelos grupos carboxilatos presentes na superfície da nanopartícula que promovem repulsão eletrostática. Apesar de antigo, o método de redução com citrato de sódio ainda continua sendo usado quando se desejam partículas com diâmetro médio de 12-50 nm. (ZHU, VASILEV, *et al.*, 2003)

O ouro apresenta como grandes vantagens a biocompatibilidade, síntese relativamente simples, o controle do tamanho das nanopartículas, facilidade de modificação química de sua superfície, e facilidade de caracterização devido à presença de uma banda de absorção associada à ressonância dos plasmon superficiais. (JAIN, EL-SAYED e EL-SAYED, 2007)

A redução do tamanho das partículas para a escala nanométrica é responsável por alterações consideráveis em propriedades fundamentais do ouro, como a cor. Nanopartículas de ouro em solução apresentam intensa coloração avermelhada, vinho ou arroxeadas, contrastando com o ouro metálico amarelo. (TURKEVICH, 1985)

3.2. O efeito de ressonância de plasmon de superfície

A origem física da absorção de luz pelas nanopartículas metálicas está na oscilação coerente dos elétrons da banda de condução induzida pelo campo

eletromagnético. Essa ressonância é também conhecida como ressonância de plasmon de superfície (da sigla inglesa SPR) que é, na verdade, um efeito de nanopartículas metálicas, já que ele não existe nos átomos individuais, assim como no sólido. (KREIBIG e VOLLMER, 1995)

Quando a matéria é exposta à luz, uma série de processos pode ocorrer: a luz pode ser absorvida, refletida ou espalhada com a mesma frequência que a luz de entrada, a luz absorvida pode ser reemitida ou o campo eletromagnético local do entrante pode ser propagado, aumentando assim quaisquer sinais espectroscópicos de moléculas na superfície do material. (HUANG, JAIN, *et al.*, 2007) Na FIG.1 são apresentadas as reações da nanopartícula de ouro resultantes da absorção de luz.

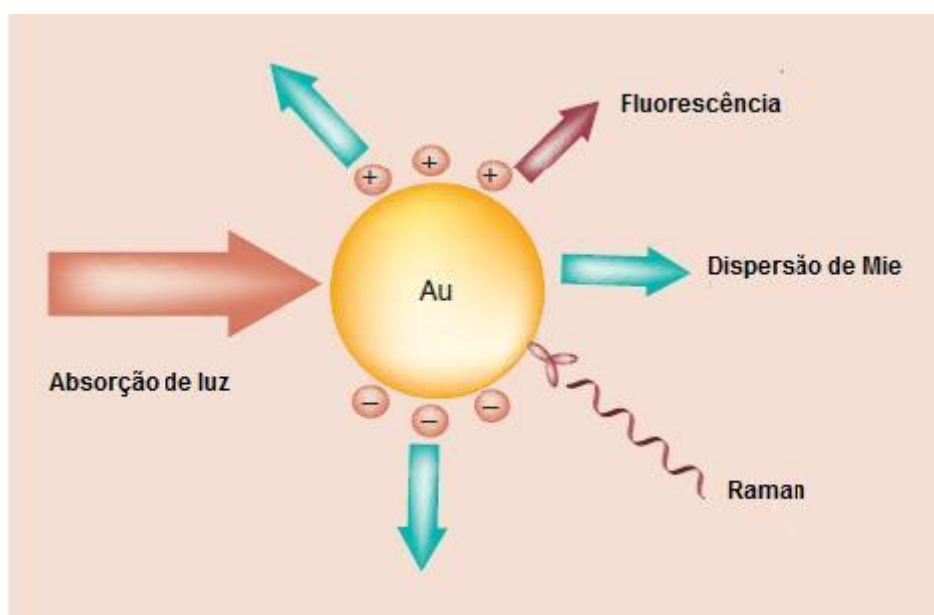


FIGURA 1: Processos ópticos importantes resultantes da absorção de luz em uma nanopartícula de ouro. Dispersão de Mie, Fluorescência e espalhamento Raman de moléculas adsorvidas. (HUANG, JAIN, *et al.*, 2007)

O efeito de ressonância de plasmon de superfície é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e outro, um dielétrico. (CARVALHO, RATH e KUBOTA, 2003) Quando as nanopartículas de ouro (AuNps) absorvem luz, seus elétrons são excitados, a excitação na frequência de ressonância plasmônica causa uma oscilação coletiva dos elétrons livres. A frequência de ressonância plasmônica é uma importante característica das AuNps e possui comprimentos de onda de aproximadamente 510 e 530 nm para

nanopartículas com diâmetro entre 4 e 50 nm, mas pode haver variações quando se tratar de outros diâmetros como comprimentos de onda verificados entre 520 e 570 nm, (SIERRA-RODERO, FERNANDEZ-ROMERO e GOMEZ-HENS, 2011) pois a ligação e proximidade de moléculas de superfície pode modificar o comprimento de onda de absorção. (SPERLING, RIVERA-GIL, *et al.*, 2008; HUANG e EL-SAYED, 2009)

A absorção de plasmon de superfície é extremamente sensível a alterações na forma da nanopartícula. (TIWARI, 2007) Para nanoesferas de ouro, esta ressonância ocorre na região espectral visível a cerca de 520 nm, o que é a origem da cor vermelha brilhante das nanopartículas em solução. (TURKEVICH, 1985)

Nanopartículas de ouro absorvem fortemente a luz, como resultado da característica de sua SPR, essa absorção depende diretamente do tamanho, forma e constante dielétrica da partícula. Quando o formato da nanopartícula é alterado, a absorção SPR se divide em duas bandas: a banda de longo comprimento de onda mais forte no infravermelho, e uma banda de curto comprimento de onda fraca na região do visível devido à oscilação transversal eletrônica. (HUANG, JAIN, *et al.*, 2007)

3.3. Albumina Sérica Bovina

A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais abundante no sangue bovino, com uma concentração média de 50mg/ml e possui uma estrutura muito similar à estrutura da HSA (*Human Serum Albumin*), apresentando uma boa percentagem de sequências idênticas de aminoácidos. O peso molecular de BSA é de 66,462 g/mol de acordo com a literatura. (SONAVANE, TOMODA, *et al.*, 2008; SIERRA-RODERO, FERNANDEZ-ROMERO e GOMEZ-HENS, 2011)

A BSA é formada por uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios. O ponto isoelétrico (PI) da BSA está em torno de 4,70, (SPERLING, RIVERA-GIL, *et al.*, 2008) indicando a faixa de pH em que a molécula se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. Em meio neutro (pH = 7,0) a BSA é carregada negativamente e sofre

mudanças conformacionais. (SONAVANE, TOMODA, *et al.*, 2008) A estrutura molecular da albumina sérica bovina pode ser verificada abaixo na FIG. 2.



FIGURA 2: Estrutura molecular da albumina sérica bovina. (CHINNATHAMBI, KARTHIKEYAN, *et al.*, 2015)

A BSA pode apresentar até quatro conformações estruturais que variam com o tipo do aminoácido, o tamanho da cadeia e a configuração espacial da cadeia polipeptídica, são elas: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. (RUSSEL, 2010)

É chamada de estrutura primária a sequência de aminoácidos que compõe a cadeia polipeptídica, através dela se deriva todo o arranjo espacial da molécula.

Os arranjos de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína podem apresentar rotação nas ligações entre os carbonos alfa dos aminoácidos e seus grupos amina e carboxila permitindo a obtenção das estruturas secundárias.

A estrutura terciária é resultado do enrolamento da hélice, se caracterizam pelas interações de longa distância entre aminoácidos, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e bissulfeto.

A junção de cadeias polipeptídicas (cadeias de aminoácidos) é a chamada estrutura quaternária, são estruturas de caráter oligomérico, que estão compostas por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária, (RUSSEL, 2010) conforme pode ser verificado na FIG.3.

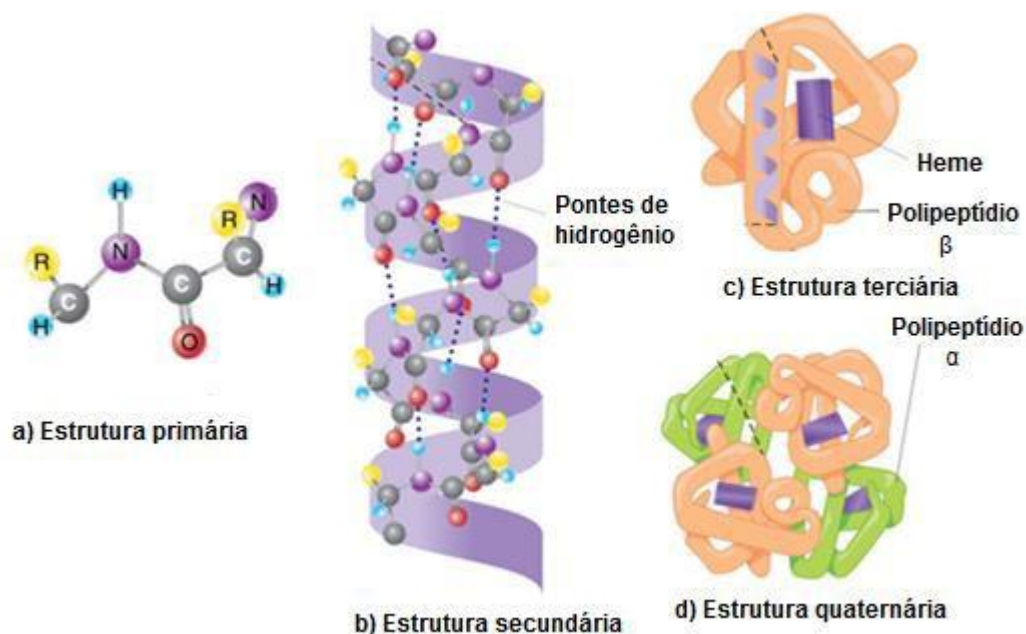


FIGURA 3: Conformações estruturais de cadeias polipeptídicas. a) Estrutura primária; b) Estrutura secundária; c) Estrutura terciária; d) Estrutura quaternária. (RUSSEL, 2010)

A fluorescência intrínseca das moléculas de albumina é em grande parte atribuída aos resíduos de triptofano presentes na molécula, com apenas uma menor contribuição das numerosas tirosinas, dependendo do comprimento de onda de excitação observada. Os resíduos de triptofano são altamente sensíveis ao seu ambiente local, e podem ser usados para observar as mudanças nos espectros de emissão de fluorescência da albumina devido a mudanças conformacionais na proteína, ligações com substratos ou desnaturação. (TOGASHI, RYDER, *et al.*, 2007)

A capacidade de uma proteína resistir a fatores adversos como agentes desnaturantes ou temperatura é o que define o termo estabilidade protéica, isto é, sua aptidão em manter a integridade molecular e função biológica frente a esses e outros fatores. O fenômeno de desnaturação é caracterizado pelo desdobramento da estrutura terciária da proteína em um polipeptídeo desorganizado em que seus ligantes deixem de interagir e estar alinhados na forma estrutural estável. (FAGAIN, 1995)

A desnaturação, agregação ou a modificação das cadeias laterais da molécula podem muitas vezes resultar na perda da bioatividade ou no aumento da imunogenicidade da proteína. Apesar destes desafios, os avanços na

estabilização e preparação de formulações permitiram a chegada ao mercado de centenas de fármacos protéicos. (PUTNEY, 1998)

A BSA realiza funções no organismo como a eliminação de radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabólitos lipofílicos tóxicos, como a bilirrubina, (SPERLING, RIVERA-GIL, *et al.*, 2008) além de ser o principal transportador de ácidos graxos os quais são de outra forma, insolúveis no plasma sanguíneo. A albumina apresenta também afinidade por hematinas, pequenos compostos aromáticos negativamente carregados e cria ligações covalentes com cisteína, piridoxil e vários metais como o cobre, níquel, mercúrio, prata e ouro. (TAN, LIANG, *et al.*, 2013) A fisiologia da albumina quando aplicada ao cenário clínico apresenta diversas utilidades práticas para o organismo, (SONI e MARGARSON, 2004) elas incluem:

- A albumina compreende grande parte da proteína total do compartimento intravascular;
- É uma molécula de transporte que liga reversivelmente íons e ânions, bem como uma série de outros metabólitos e fármacos;
- Ela atua como um agente oncótico e contribui como um grande componente para a pressão plasmática e pressão oncótica;
- Possui efeito anticoagulante, através da inibição da agregação plaquetária;
- É um eliminador de radicais livres;
- Tem papel fundamental na manutenção da permeabilidade da membrana.

A albumina é um veículo macromolecular biodegradável, fácil de purificar e solúvel em água, facilitando a entrega de fármacos por injeção e, portanto, candidata ideal para a preparação de nanopartículas. (ELZOGHBY, SAMY e ELGINDY, 2012) A adsorção de proteínas é o primeiro processo que ocorre após a implantação de um biomaterial num sistema biológico. As moléculas de proteína adsorvidas na interface entre um biomaterial e o ambiente fisiológico podem influenciar e controlar as reações subsequentes e até mesmo determinar à aceitação ou rejeição do material implantado. (TOGASHI, RYDER, *et al.*, 2007)

3.4. Métodos de obtenção de nanopartículas de ouro

A síntese de AuNps consiste basicamente na redução de um sal de ouro (III), utilizando agentes redutores e estabilizantes ou por métodos físicos como irradiação, método sonoquímico, radiação ultravioleta, ablação por laser, processo termolítico e processo fotoquímico evitando assim a aglomeração das partículas modificadas. (GACHARD, REMITA, *et al.*, 1998) Métodos biológicos também são utilizados com aplicação de fungos ou bactérias como fonte para a produção de nanopartículas, sendo uma alternativa para evitar o uso de solventes orgânicos. (KHAN, VISHAKANTE e SIDDARAMAIAH, 2013) Os agentes mais comumente utilizados na redução química do ouro são citrato de sódio ou borohidreto de sódio.

Brust *et al.* (BRUST, WALKER, *et al.*, 1994) verificaram a obtenção de nanopartículas de ouro a partir de nanocristais utilizando como agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4) em temperatura ambiente. Desde então essa técnica passou a ser amplamente adotada até os dias atuais em diversos experimentos com redução da partícula de ouro. (BRUST, WALKER, *et al.*, 1994)

Estudos reportam também a síntese de nanopartículas de ouro com diferentes agentes redutores, entre eles a *Centella asiática*, uma vez que fitoquímicos presentes no extrato atuam como efetivos agentes redutores e de estabilização (DAS, BORTHAKUR e BORA, 2010) assim como a *Centella asiática*, o uso de quitosana para a síntese de nanopartículas de ouro também tem chamado a atenção dos pesquisadores (XIANG, LI, *et al.*, 2015; BAO, HOU, *et al.*, 2015) devido à abundância natural e propriedades como biodegradabilidade, bioatividade além de não apresentar toxicidade. (KATTI, 2016)

O polímero Poli(vinilpirrolidona) (PVP), é uma outra alternativa como estabilizante em colóides metálicos, pois pode associar-se ao metais devido a grupos funcionais como o oxigênio da carbonila, o nitrogênio da amida e a presença de longas cadeias poliméricas. (ABEDINI, DAUD, *et al.*, 2013)

Baseado em métodos clássicos apresentados por Turkevich *et al.* (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1951) surgiu a utilização de citrato de

sódio na redução química do sal de ouro (Au^{3+}) em ouro reduzido (Au^0) promovendo a obtenção de nanopartículas com aproximadamente 20 nm de diâmetro. (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1951)

A molécula de citrato de sódio é formada por grupos carboxilatos responsáveis por sua ligação na superfície do ouro, como pode ser observado na FIG. 4.

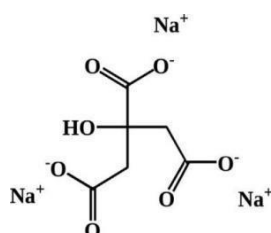


FIGURA 4: Estrutura molecular do Citrato de Sódio. (WULANDARI, NAGAIRO, *et al.*, 2015)

Doyen et al. (DOYEN, BARTIK e BRUYLANTS, 2013) sugeriu recentemente que o citrato de sódio forma agregados com os átomos Au^{3+} e/ou Au^0 e se comporta como uma ligação molecular auxiliando na formação das nanopartículas. O aumento da degradação radiolítica (que consiste na oxidação com a descarboxilação) do citrato pelo oxigênio dissolvido e catalisado pelo ouro tem como vantagem o efeito de formação das AuNps. (HANZIC, JURKIN, *et al.*, 2015)

O citrato de sódio ligado à superfície da AuNp atua promovendo a estabilização da nanopartícula. Na FIG.5 observa-se como ocorre essa reação.

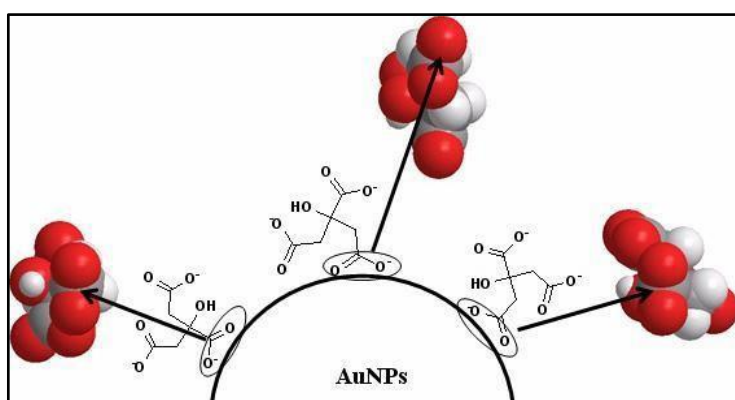


FIGURA 5: Ilustração mostrando a ligação do citrato de sódio à superfície das nanopartículas de ouro. (WULANDARI, NAGAIRO, *et al.*, 2015)

As nanopartículas de ouro obtidas com citrato de sódio são formadas partindo-se da redução do ouro pela adição do citrato, formando partículas com diferentes planos cristalográficos variando de acordo com a concentração de agente redutor.

3.5. O uso de nanopartículas de ouro na medicina

Na nanomedicina são abordados o uso de nanopartículas direcionadas a um sítio de ação específico. Trata-se de uma inovação em ciências farmacêuticas onde é permitido ultrapassar as limitações de sistemas clássicos de veiculação e desenvolver novas estratégias de diagnóstico e tratamento. (KATTI, 2016)

Existem já no mercado, nanopartículas bioconjugadas para utilização em análises bioquímicas e anticorpos associados à nanopartículas metálicas de ouro, que permitem um aumento da sensibilidade de imunoenaios, por ampliação do sinal de detecção dos anticorpos ligados aos seus antígenos. (KIRUI, REY e BATT, 2010; COLE, ROSS, *et al.*, 2015)

Embora o câncer seja uma doença relativamente comum, nas últimas décadas tem-se tornado um evidente problema de saúde pública mundial. Os tratamentos básicos para o câncer são cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é o tratamento mais utilizado, porém a maioria dos agentes quimioterápicos são muito tóxicos e inespecíficos causando também danos às células saudáveis.

A remoção cirúrgica do câncer muitas vezes é efetiva, porém podem ocorrer complicações pós-operatórias e a sua realização depende da localização do tumor. O desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos permitiria a racionalização da terapia medicamentosa levando à doses ideais e consequente redução de efeitos colaterais indesejáveis. (LEE e WANG, 2006)

As nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas para tratamentos antitumorais de hipertermia a laser localizado. A terapêutica térmica é superior às

técnicas convencionais, pois são minimamente invasivas e fáceis de aplicar, com grande capacidade de tratar tumores enraizados em regiões vitais onde a ressecção cirúrgica não é possível. (LANCU, 2013) Técnicas simples de aquecimento não podem diferenciar entre o tumor e o tecido normal circundante, muitas vezes aquecendo os tecidos encontrados entre a fonte e o local alvo. A terapia fototérmica é capaz de produzir necrose seletiva de células malignas. (RAHMAN, BISHARA, *et al.*, 2009; LANCU, 2013; MESBAHI, 2010)

Devido à forte absorção de plasmon de superfície, as nanopartículas de ouro oferecem grande potencial em aplicações de terapia fototérmica. Aplica-se um feixe de laser que causa o aquecimento local, quer pela energia cedida pelo laser, quer pela ressonância plasmônica das nanopartículas metálicas, fazendo-as vibrar e aquecer, cedendo energia que destrói os tecidos patológicos. (GANGOPADHYAY, GALLET, *et al.*, 2005)

Se as nanopartículas forem incorporadas ou incubadas com biomoléculas, células ou tecidos, esta energia térmica irá causar o aumento acentuado da temperatura local em torno das nanopartículas e, assim, provocar o dano dos materiais circundantes. (HUANG, JAIN, *et al.*, 2007; BHATTACHARYYA, KUGDUS, *et al.*, 2011; KIRUI, REY e BATT, 2010)

Se os tumores pudessem ser carregados com ouro, isto conduziria a uma dose mais elevada para o tecido canceroso em comparação com a dose recebida por tecido saudável durante um tratamento de radioterapia. Os estudos indicam que este aumento da dose pode ser significativo de até 200% ou mais. (ZHANG, GUO, *et al.*, 2009; HAINFELD, DILMANIAN, *et al.*, 2008)

É importante considerar também que certos órgãos retêm partículas com dimensões específicas, por isso a necessidade de partículas com tamanho ideal ao órgão. A distribuição no sistema retículo endotelial é dependente do tamanho de partícula. As partículas da ordem de 1 μm são captadas pelo baço, as partículas menores do que 0,02 μm pela medula óssea e sistema linfático e, partículas de tamanho entre os dois limites citados acima, pelo fígado. (CAMMAROSANO, 1979)

3.6. Radiação nuclear e radiação gama aplicada à nanopartículas de ouro

3.6.1. Radiação nuclear

No ano de 1895, o pesquisador Wilhelm Roentgen descobriu uma nova espécie de radiação produzida pela descarga elétrica ocorrida em um gás a máxima pressão, denominada Raios-x, esta nova radiação penetrava facilmente dentro e através de objetos e durante sua emissão o vidro do tubo onde ela ocorria tornava-se fluorescente. (HARVEY, 1969)

Um ano depois Henry Becquerel, cientista francês, experimentou colocar suas amostras fluorescentes sobre chapas fotográficas, devidamente protegidas da luz visível, e após a revelação das chapas, Becquerel verificou que suas amostras com substâncias fluorescentes (sulfato de urânio e potássio) emitiam também radiação. Aprofundando seus estudos, Becquerel provou que qualquer composto de urânio podia sensibilizar as chapas fotográficas da mesma maneira que as substâncias fluorescentes. Acidentalmente foi então descoberta a radioatividade. (HARVEY, 1969)

Após anos de estudo sobre este fenômeno ficou comprovada a existência de dois tipos de radiações emitidas pelas substâncias radioativas, a primeira delas, partículas alfa ou íons de hélio carregados positivamente e a segunda, partículas beta ou elétrons movendo-se a velocidades extremamente altas. (HARVEY, 1969)

Em 1903 Pierre Curie apresentou o metal Rádio, recém descoberto, o qual possuía a peculiaridade de estar sempre mais quente do que o meio ambiente. (PAROLARI, 2013)

No fenômeno da radioatividade as reações não dependem do estado químico ou físico de uma amostra, a desintegração radioativa é uma propriedade exclusiva do núcleo atômico e a velocidade dessa desintegração não pode ser afetada por fatores externos, ela depende unicamente da espécie e número de núcleos presentes no átomo. (HARVEY, 1969)

Esse número de desintegrações de uma fonte radioativa é atualmente expresso em becquerel, um becquerel (Bq) consiste em um decaimento por segundo e um Curie (Ci) corresponde a $3,70 \times 10^{10}$ Bq.

As desintegrações se dão pelo excesso de energia depositado no núcleo do átomo, este por sua vez sofre uma desintegração alfa e acaba por excitar outro núcleo presente no átomo, o núcleo excitado emite esse excesso de energia na forma de um raio gama. (PAROLARI, 2013) A meia vida dos elementos radioativos é definida pelo momento em que a concentração de núcleos do átomo é reduzido pela metade de seu valor original. A desintegração beta em alguns casos pode ocorrer da mesma maneira que a alfa, levando o núcleo ao estado excitado como consequência de uma desintegração, existirão, portanto, raios gama produzidos como consequência da passagem daquele estado excitado ao estado fundamental. (HARVEY, 1969)

A desintegração de um núcleo não emite apenas elétrons negativos, há também outros dois tipos de desintegração que constituem basicamente o mesmo processo. Alguns núcleos emitem elétrons carregados positivamente (pósitrons) que são idênticos aos elétrons negativos exceto pela carga, também no caso dos pósitrons, o espectro de energia é contínuo e deve-se supor que um neutrino (partícula neutra emitida ao mesmo tempo da emissão beta) é gerado simultaneamente com cada emissão de um pósitron. Naturalmente após a emissão de um pósitron, a carga positiva do núcleo é reduzida em uma unidade.

Uma alternativa para a emissão do pósitron é a captura de um elétron negativo de uma das órbitas eletrônicas próximas ao núcleo, nesse caso a carga nuclear também é reduzida em uma unidade e um neutrino é emitido. Vários núcleos apresentam ambos os processos. A desintegração beta pode se referir então a desintegração β^- , desintegração β^+ e captura eletrônica. (HARVEY, 1969)

Os fenômenos resultantes da interação da radiação com a matéria são muito importantes em vários campos da ciência, as partículas carregadas (prótons, partículas alfa, elétrons, entre outros) quando atravessam materiais sólidos, líquidos ou gasosos perdem a sua velocidade rapidamente, ao atravessar esses materiais colidem com elétrons atômicos e perdem certa quantidade de energia cinética em cada colisão. Já os elétrons atômicos atingidos podem alcançar níveis energéticos mais elevados devido à colisão ou podem ser deslocados da coroa atômica e assim produzir um íon positivo e um elétron livre.

As moléculas as quais pertencem os átomos excitados ou ionizados podem se decompor provocando efeitos químicos, se essas moléculas fizerem parte de um sistema vivo, poderão ocorrer modificações biológicas nesse sistema, como alteração ou destruição das células vivas. (HARVEY, 1969)

Para uso na medicina, os produtos radioativos dividem-se entre preparações que se destinam ao diagnóstico e terapia. Compostos radioterapêuticos irradiam focos patológicos produzindo efeitos cicatrizantes ou de cura. Preparações radiodiagnósticas devem produzir efeitos de radiação pelo corpo e ao mesmo tempo serem detectadas por instrumentos de medidas externas. (CAMMAROSANO, 1979)

Compostos radioterapêuticos geralmente são isótopos de meia vida curta, emissores de partículas beta de alta energia. Essas partículas irradiam uniformemente o órgão afetado. Muitas vezes prefere-se usar um elemento emissor de raios gama fracos e beta de alta energia, desta maneira a localização do radioisótopo no órgão pode ser determinada pelos raios gama e a baixa energia evita irradiação dos tecidos vizinhos. (CAMMAROSANO, 1979)

O primeiro e até agora um dos isótopos mais usados em preparações coloidais radioterapêuticas é o ^{198}Au , ele possui meia vida de 2,69 dias e decai por emissão de partículas beta. O decaimento se dá por espectros $E_{\beta} = 0,29 \text{ MeV}$ (1,1%), $0,96 \text{ MeV}$ (98,9%), ao nível de excitação $1,088$ e $0,412 \text{ MeV}$ do mercúrio (^{198}Hg) respectivamente, e por um espectro $E_{\beta} = 1,37 \text{ MeV}$ (0.03%) ao nível fundamental do mercúrio (^{198}Hg). O ouro emite também três raios gama de espectro $E_{\gamma} = 0,4118 \text{ MeV}$ (99.8%), $0,676 \text{ MeV}$ (0,9%) e 1.088 MeV (0,16%) que podem ser observados na FIG. 6. (CAMMAROSANO, 1979)

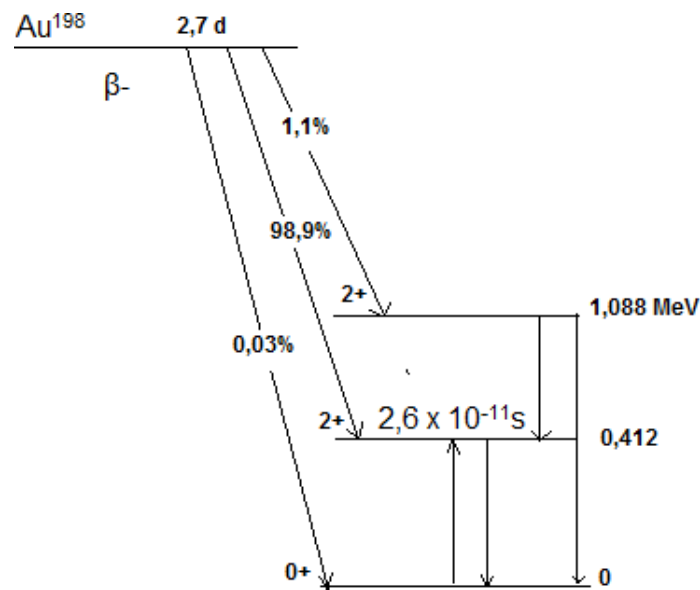


FIGURA 6: Esquema de decaimento do ^{198}Au . (CAMMAROSANO, 1979)

As flechas verticais representam emissões de raios gama, as flechas em diagonal representam o decaimento por emissão de partículas alfa. O esquema de decaimento do ouro 198 em geral ocorre por uma emissão beta para um estado excitado de mercúrio 198, seguido por emissões gama para o estado fundamental de mercúrio 198. (COLMERY, 1951)

O alcance máximo da radiação beta no tecido ou na água é 3,8 mm e o alcance médio é 1 mm, portanto, por causa de seu alcance pequeno o ^{198}Au pode produzir um efeito considerável sobre tumores no tecido sem causar um dano excessivo à estrutura normal que o circunda. (CAMMAROSANO, 1979)

3.6.2. Radiação gama

Os raios gama são radiações eletromagnéticas emitidas durante as transições nucleares. Conforme já citado anteriormente, a procura de uma

configuração mais estável faz com que um núcleo atômico excitado elimine seu excesso de energia na forma de uma emissão gama. O elemento Cobalto (^{60}Co) é o radionuclídeo mais comumente utilizado, ele é produzido em reator nuclear e posteriormente encapsulado em uma estrutura de aço para que não ocorra possíveis vazamentos do material. (FRANÇA e BARBOZA, 2011)

O ^{60}Co é um emissor beta/gama com meia-vida de 5,2 anos, apresentando alto poder de penetração. Em seu espectro pode-se observar dois picos de decaimento correspondentes à emissão gama, com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV. (FRANÇA e BARBOZA, 2011)

As mudanças químicas em soluções aquosas são induzidas pela radiação ionizante, através das espécies radiolíticas produzidas pela radiólise da água, e conseqüentemente a formação do radical de hidrogênio ($\text{H}\cdot$), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), e elétrons aquosos (e^{-aq}). (WALKER, PUSHPAVANAM, *et al.*, 2013)

Em proteínas celulares como a albumina sérica bovina, os radicais de oxigênio podem aumentar sua degradação pelas proteases e peptidases intracelulares, e prejudicar subseqüentemente o DNA da molécula. (DAVIES e DELSIGNORE, 1987) O efeito da radiação γ na conformação protéica parece depender de vários fatores, como concentração de proteínas, presença de oxigênio e estrutura quaternária.

Geralmente, a radiação causa mudanças irreversíveis no nível molecular pela quebra das ligações covalentes de cadeias polipeptídicas. Os Radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) gerados pela radiação modificam a estrutura primária das proteínas, o que resulta na distorção das estruturas secundárias e terciárias. (GABER, 2005) As ligações cruzadas covalentes são formadas entre aminoácidos livres e proteínas, e entre peptídeos e proteínas em solução após irradiação. (GABER, 2005)

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes

Para concretização deste estudo foram utilizados os seguintes reagentes:

- ✓ Folhas de ouro 99,9% de pureza determinada por espectro gama;
- ✓ H₂O desionizada Milli-Q;
- ✓ Citrato de sódio 99% da marca Synth;
- ✓ Ácido Clorídrico 37% da marca Alphatec;
- ✓ Ácido Nítrico 65% da marca Alphatec;
- ✓ Fosfato de sódio bibásico da marca Synth;
- ✓ Fosfato de sódio monobásico da marca Dinâmica;
- ✓ Hidróxido de sódio 97% da marca Synth;
- ✓ Albumina sérica bovina fração V, adquirida da Sigma-Aldrich;
- ✓ Ácido 3-mercaptopropionico (MPA) adquirido em Sigma-Aldrich;
- ✓ Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) adquirido em Sigma-Aldrich;
- ✓ N-hidroxi-succinimida (NHS) adquirido em Sigma-Aldrich;
- ✓ Papel *Whatman* 3MM;
- ✓ ITLC-SG (Al) – fibra de vidro (*Gelman Sciences*);
- ✓ Solução de NaCl 0,9%.

4.2. Caracterizações

As análises de espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis) foram realizadas em equipamento Varian Cary 1E UV-VIS Spectrophotometer, entre os comprimentos de onda 350 a 800 nm, disponível no Centro de Química e Meio Ambiente-IPEN.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro da empresa Photon Technology International, INC modelo Fluorescence Master System, disponível no Instituto de Química da USP.

As medidas de Espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta foram realizadas no instituto de Química da USP em equipamento Zetasizer Nanoseries - nanozs da Malvern.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas em microscópio modelo JEOL JEM 2100 com filamento de hexa boreto de lantânio LaB₆, operando em aceleração de 200 kV, disponível no Instituto de Química da USP.

A análise cromatográfica das amostras radioativas foi realizada em contador automático tipo poço, modelo CR 643, Cobra II, *Packard – Canberra* (EUA), disponível no Centro de Radiofarmácia do IPEN.

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1. Síntese de nanopartículas de ouro (¹⁹⁷Au)

Aproximadamente, 10 mg de ouro em folha 99,9% de pureza foi pesado em balança analítica, adicionado a um balão reacional de fundo redondo com capacidade para 125 ml e 150 µl de água régia foram adicionados, a fim de garantir a completa dissolução da folha de ouro. Após a completa dissolução do

ouro, o excesso de ácidos e água foram removidos utilizando um sistema de vácuo em pressão média de 160 mmHg.

Foram adicionados 100 ml de H₂O, uma barra de agitação de 1,5 cm que foi mantida à velocidade aproximada de 1000 rotações por minuto (RPM) e a solução foi aquecida à ebulição.

Ao entrar em ebulição foram adicionados 4 ml de citrato de sódio 34 mM à solução de ouro em constante agitação, em alguns segundos a solução mudou de amarelo pálido para cinza e em seguida vermelho. Após o completo resfriamento, a solução foi transferida para um frasco limpo, seco, bem fechado e armazenada em geladeira à aproximadamente 4°C.

4.3.2. Modificação com BSA

Foram adicionados 500 µl de uma solução de ácido 3-mercaptopropionico (MPA) em concentração 1 mM, visando a modificação da superfície das partículas através da inserção de grupos carboxílicos que a estabilizam e favorecem sua posterior ligação com outras moléculas. A esta solução foi adicionada um composto de NaOH 1 M para ajuste do pH da amostra em 7 e uma solução tamponante de fosfato de sódio cuja concentração final foi de 1 mM.

A modificação com BSA foi realizada pela adição desta nas suspensões de AuNps e 20 µl de uma mistura de EDC/NHS 1mM, importante catalisador para a formação de amidas, auxiliando a ligação entre BSA e AuNp.

4.3.3. Modificação com raios gama

As amostras de AuNps modificadas com uma concentração de 0,25mg/mL de BSA foram submetidas a doses de radiação gama compreendidas

entre 0,1kGy a 10kGy, realizadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR-IPEN/SP) em irradiador de ^{60}Co tipo Gammacell-220, com atividade de 1kGy/hora.

4.3.4. Síntese de nanopartículas com ouro ativo (^{198}Au)

A síntese de nanopartículas com ouro ativo (^{198}Au) foi realizada no prédio do Centro de Radiofarmácia (CR – IPEN/SP) sob a supervisão do responsável pela proteção radiológica no local. A amostra de 10 mg de ^{197}Au foi submetida a irradiação por nêutrons no reator nuclear IEA-R1, em fluxo de $4,5 \times 10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ localizado no IPEN/SP. Após a retirada e transporte do material (^{198}Au) ao CR com a supervisão da proteção radiológica, foi realizado o procedimento de dissolução da folha de ouro e secagem conforme descrito anteriormente. Todo o processo de síntese seguiu as mesmas condições e procedimentos descritos no item 4.2.1, atentando-se à diferença de que no caso do processo com ouro ativo (^{198}Au), todo o experimento foi realizado em capela com proteção por placas de chumbo e supervisão da radioproteção.

Após a síntese, adicionou-se 3-MPA, solução tamponante e modificou-se a suspensão de AuNps com BSA em concentração final igual a 0,25mg/mL. Considerando-se que a meia vida do ^{198}Au é 2,7 dias, foram realizadas as caracterizações das amostras, após 37 dias, assim que apresentaram taxa de decaimento aprovada para liberação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese de Nanopartículas de ^{197}Au

A síntese de nanopartículas de ^{197}Au foi realizada a partir da dissolução de uma folha de ouro com pureza igual ou superior a 99,9%, pesando 10mg e medindo aproximadamente 5mm de diâmetro e espessura de 0,5mm, semelhante a apresentada na FIG.7.



FIGURA 7: Folha de ouro utilizada para dissolução e posterior síntese de nanopartículas.

Este processo garante amostras com maior teor de pureza e ao ser irradiado, assegura-se que apenas átomos de ouro sejam bombardeados com nêutrons, além de garantir um processo de alto controle em todas as etapas.

A completa dissolução da folha de ouro ocorreu por sua oxidação (Au^0 para Au^{3+}) com água régia ($3\text{HCl}/1\text{HNO}_3$), utilizando $150\mu\text{L}$, o suficiente para total cobertura da folha de ouro. Após cerca de 5 min a amostra já apresentava-se totalmente dissolvida.

A evaporação do ácido utilizado na oxidação do ouro foi realizada com o auxílio de uma bomba de vácuo, a contaminação da bomba por ácido foi evitada por um sistema condensador que reteve os resíduos ácidos antes que esses pudessem chegar à bomba. O sistema de diluição da folha e secagem do ácido está representado na FIG.8.



FIGURA 8: Equipamentos e esquema montado para evaporação de ácidos evitando a contaminação da bomba de vácuo.

Ao ouro oxidado foi adicionada água deionizada, formando uma solução límpida amarelo claro. A solução foi mantida em constante agitação em banho de glicerina a fim de conservar a troca de calor em toda a amostra e, a partir desta etapa, o aquecimento da solução foi elevado até o início da ebulição. Em ebulição foram adicionados 4 ml de citrato de sódio a 34 mM, o citrato é responsável pela redução química do sal metálico (Au^{3+}) em ouro metálico (Au^0), e a concentração ideal deste composto na formulação é de grande importância, desde o sucesso na obtenção de nanopartículas até o tamanho e forma das partículas obtidas. (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1951) NA FIG. 9 pode-se observar a solução de AuNp obtida.



FIGURA 9: Solução de nanopartículas de ouro, após a realização de redução química.

A redução do tamanho das partículas de ouro à escala nanométrica é comprovada por alterações em propriedades fundamentais do ouro, como a cor. Nanopartículas de ouro em solução apresentam intensa coloração avermelhada, vinho ou arroxeadada, contrastando com o ouro metálico amarelo. (TURKEVICH, 1985)

O espectro de extinção desta primeira etapa comprova o sucesso na obtenção das nanopartículas de ouro através da banda de ressonância de plasmon de superfície localizada com um máximo em 522nm, conforme pode ser observado na FIG.10. (PUTNEY, 1998)

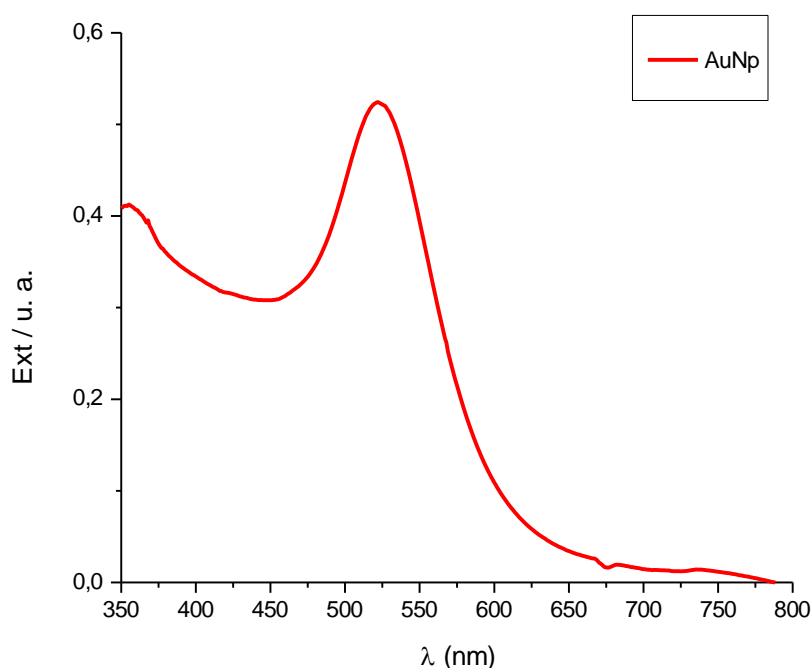


FIGURA 10: Espectro de extinção UV-Vis das AuNps após redução química por citrato de sódio. ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm}$)

A absorção de plasmon de superfície é extremamente sensível a alterações na nanopartícula. Nanoesferas de ouro apresentam ressonância na região espectral visível a cerca de 520 nm, o que é a origem da cor vermelha brilhante das nanopartículas em solução. (TURKEVICH, 1985)

As nanopartículas de ouro obtidas foram em seguida analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), onde podemos verificar a dispersão e tamanho da partícula. A partícula de AuNp após a síntese apresentou tamanhos próximos a 14 nm e boa dispersão na solução conforme verificamos na FIG.11 e

FIG.12.

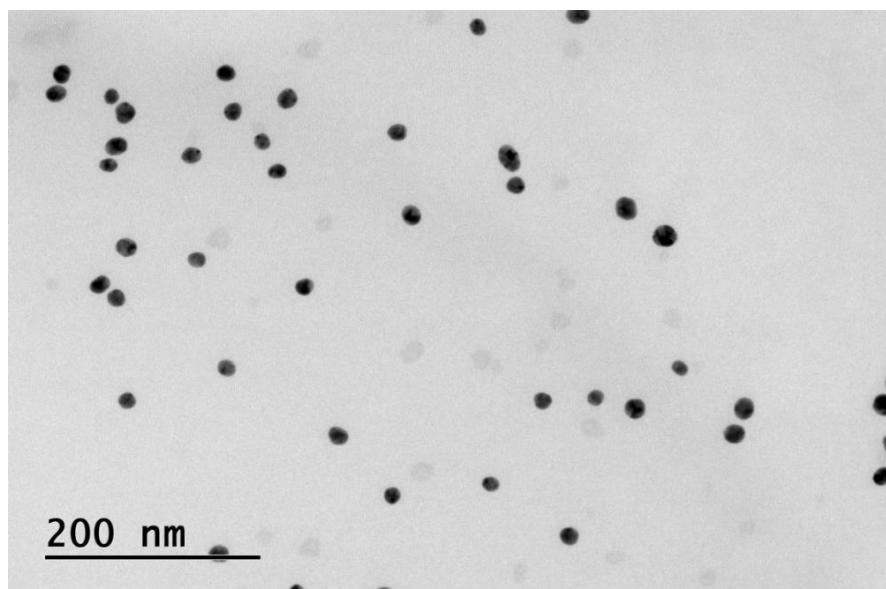


FIGURA 11: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AuNps em aproximação de 200 nm.

Nanopartículas que apresentem boa dispersão são consideradas vantajosas por retratarem um sistema com boa estabilidade, onde não há agregação de moléculas nem formação de precipitados, indicando uma suspensão pronta para conjugação com outros compostos.

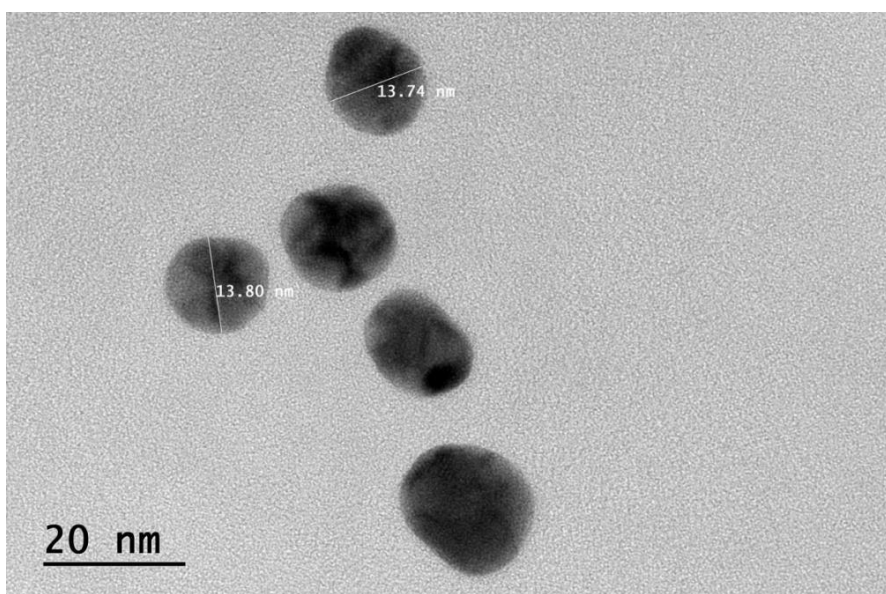


FIGURA 12: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AuNps com aproximação de 20 nm e cálculo do raio hidrodinâmico da partícula em torno de 13,8 nm.

O tamanho da partícula é considerado ideal, visando o propósito de promover a conjugação das nanopartículas com BSA, no qual pretende-se

alcançar o tamanho esperado para a finalidade proposta.

Após a caracterização das AuNps por espectroscopia eletrônica e MET, estas foram modificadas com o ácido 3-mercaptopropiônico, esta molécula possui duas funções orgânicas fundamentais para esta espécie de modificação de superfícies metálicas por biomoléculas, o grupo tiol possui uma grande afinidade por átomos de ouro, por outro lado o ácido carboxílico pode ser utilizado ligado a aminas de biomoléculas por meio de reagentes de acoplamento. (ZHU, VASILEV, *et al.*, 2003) Desta forma, à 100 m de nanopartículas de ouro foram adicionados 250 μ L do ácido 3mercaptopropiônico (3MPA) em concentração de 1g/L.

Vinte e quatro horas após a adição do 3MPA foi realizada novamente a análise de espectroscopia em UV-Vis da amostra, os grupos mercapto ligam-se à superfície do ouro, o que pode ser comprovado pelo deslocamento do máximo da banda de ressonância de plasmon para 523nm, que esta diretamente relacionada a alteração da superfície das AuNps, como pode ser verificado na FIG.13. (PERRAULT e CHAN, 2010)

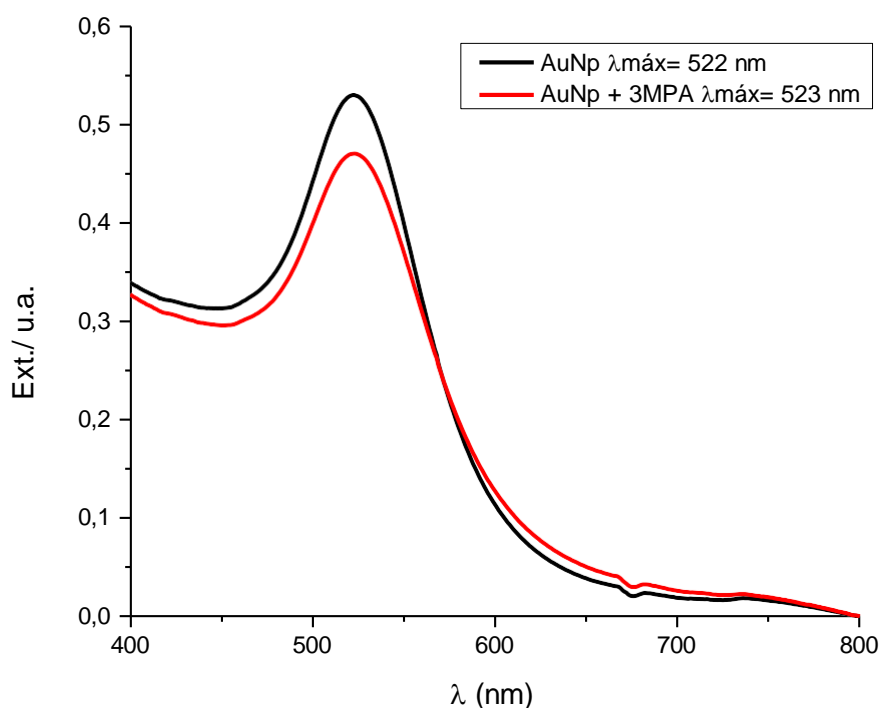


FIGURA 13: Espectros de extinção da suspensão de AuNps (preto) e AuNps acrescidas do ácido 3mercaptopropiônico (vermelho)

Após o tempo estabelecido para a reação do grupo tiol com a

superfície das nanopartículas, foi adicionado 1 ml de solução tampão fosfato de sódio 50mM (pH = 7,0) à solução final de nanopartículas, a solução tampão garante o equilíbrio e resistência da amostra nas variações de pH de misturas que possam posteriormente ser adicionadas. (CHANG, 2007)

A adição de albumina sérica bovina (BSA) à solução de AuNp, já modificada com o 3MPA, ocorreu primeiramente em diversas concentrações, a fim de constatar-se por análises de UV-Vis e Espalhamento dinâmico de luz (DLS) as alterações nos espectros de extinção e tamanho das AuNps, para tanto, a BSA foi adicionada às amostras de maneira a atingir a concentração final detalhada na TAB.1.

TABELA 1: Determinação das concentrações de BSA inseridas nas amostras.

Concentração final de BSA	Nome da amostra
Sem BSA	A-0
0,0025 mg/ml	A-1
0,025 mg/ml	A-2
0,05 mg/ml	A-3
0,25 mg/ml	A-4
0,5 mg/ml	A-5
1 mg/ml	A-6
2,5 mg/ml	A-7
0,25 mg/ml sem EDC/NHS	A-8

Junto à adição de BSA às amostras foram inclusos os reagentes Etil-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) 1mM que proporcionam o acoplamento entre os grupos ácidos carboxílicos (-COOH) às aminas primárias presentes em proteínas ou peptídeos. (HERMANSON, 2013)

O EDC é amplamente utilizado para reticulações aquosas, a

conjugação de carbodiimida atua ativando grupos carboxila que são deslocados por ataque nucleofílico preferencialmente a partir de grupos amina primários na mistura reacional.

NHS é freqüentemente incluso em protocolos de acoplamento de EDC para melhorar a eficiência ou criar intermediários estáveis. EDC acopla NHS a carboxilas, formando um éster de NHS enquanto permite uma conjugação mais eficiente à aminas primárias em pH fisiológico, sendo assim, o EDC permite que os peptídeos e proteínas sejam facilmente conjugados entre si ou com quaisquer compostos ou superfícies sólidas que contenham grupos carboxila ou amina. (HERMANSON, 2013)

Na FIG.14 é mostrado um comparativo entre os tamanhos medidos por DLS entre amostras com mesma concentração de Albumina sérica bovina, variando apenas a adição ou não dos reagentes EDC/NHS, nota-se que A-4 apresenta maior tamanho devido ao acoplamento mais eficiente das AuNps com a BSA por meio da ligação covalente promovida entre aminas e ácido carboxílico, já em A-8, sem a adição dos reagentes EDC/NHS as partículas apresentam menor tamanho por não haver a completa reação entre BSA e AuNps, ou por haver uma quantidade menor de partículas ligadas covalentemente ao ouro.

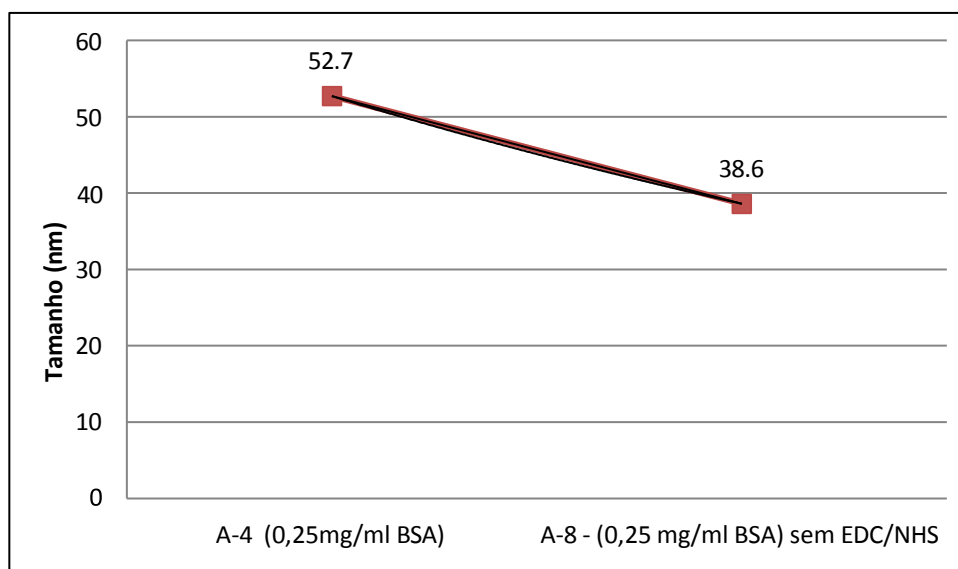


FIGURA 14: Comparativo obtido em DLS entre amostras com concentração de 0,25 mg/ml de BSA, com o agente de acoplamento EDC/NHS e sem EDC/NHS respectivamente

Após esse processo, as amostras foram analisadas por espectroscopia UV-Visível e DLS para um melhor entendimento do efeito da concentração de

BSA sobre a superfície das AuNps, de modo a controlar esta concentração evitando a adição de excesso de BSA e a presença de biomoléculas não ligadas. As FIG.15 e 16 trazem respectivamente os espectros de extinção das amostras A- 0 à A-8 e os resultados de DLS para as mesmas amostras.

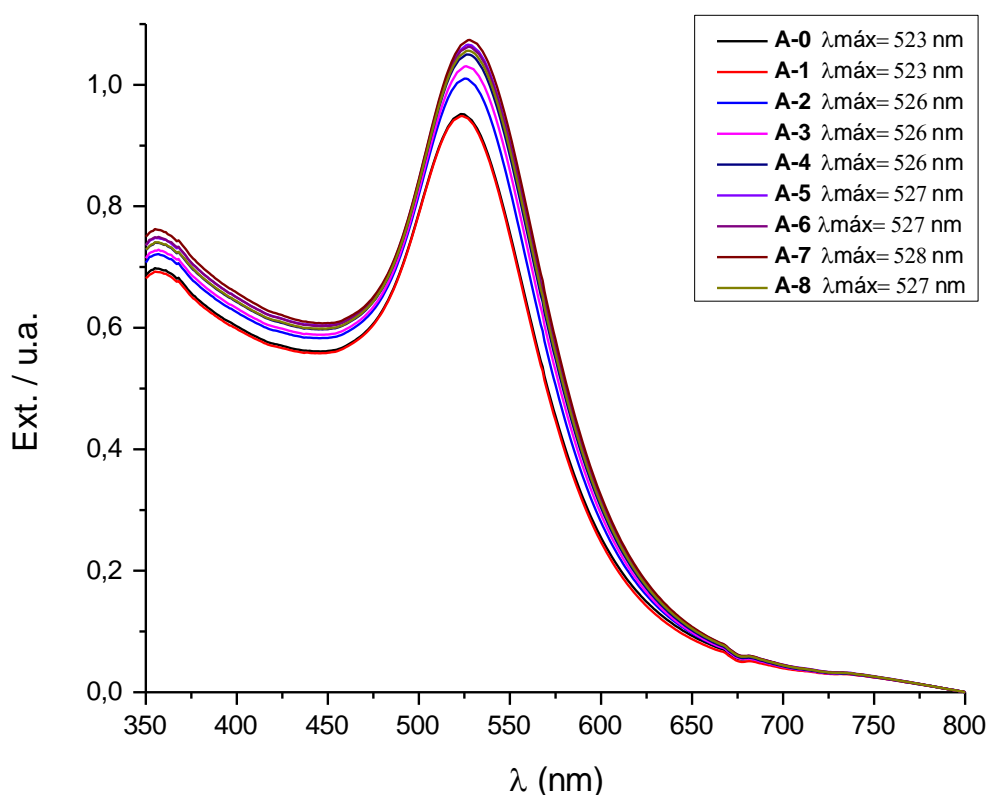


FIGURA 15: Espectro de extinção UV-Visível das amostras A-0 à A-8 sintetizadas com ^{197}Au . Evidenciando o deslocamento de banda e modificação na superfície das nanopartículas.

O deslocamento da banda de ressonância de plasmon de superfície localizada indica a modificação das AuNps por conjugação da BSA à superfície do ouro. Um valor intermediário no comprimento de onda (λ) alcançado, como no caso da amostra A-4, permite a obtenção de uma solução sem proteína excedente.

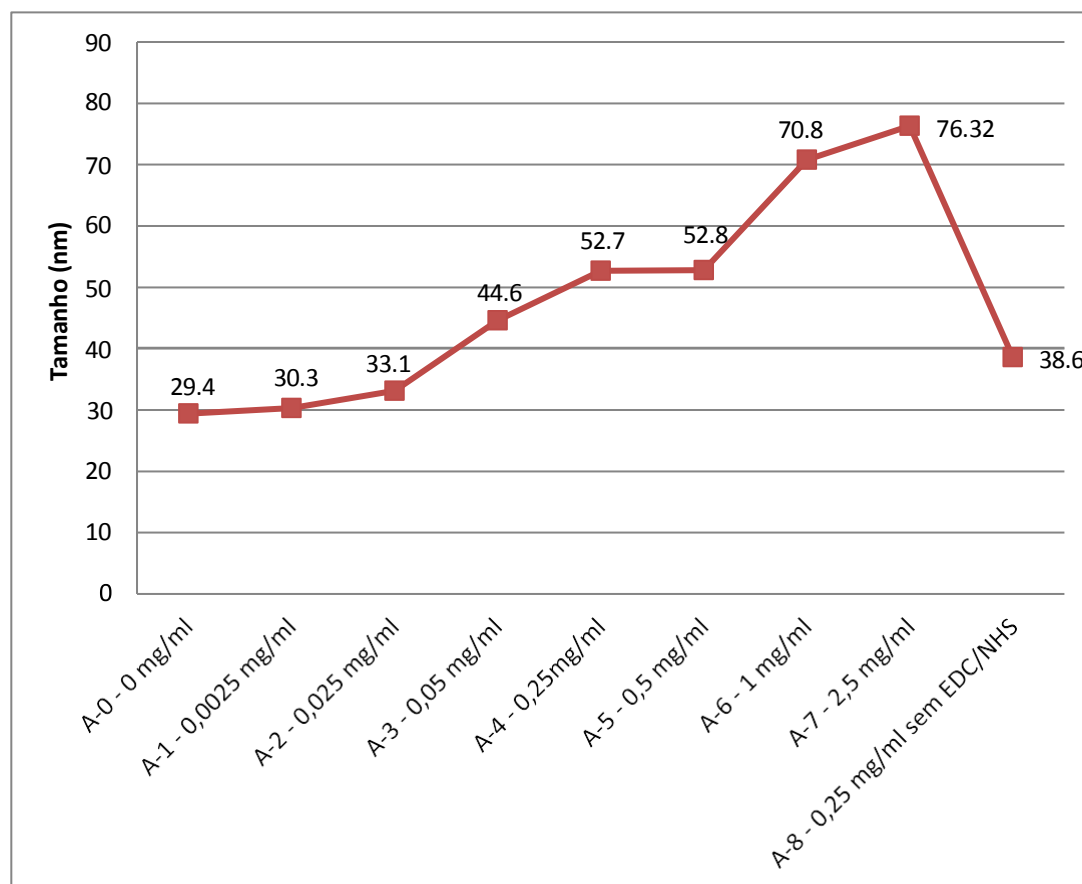


FIGURA 16: Medida de espalhamento dinâmico de luz das amostras A-0 à A-8 e dados da concentração de BSA em cada amostra, evidenciando a relação entre raio hidrodinâmico e concentração de BSA.

O aumento gradativo do tamanho das partículas analisadas evidencia a dependência da concentração de BSA em relação ao aumento do raio. A amostra A-8 onde o tamanho da partícula é consideravelmente menor, indica a importância dos reagentes de acoplamento EDC/NHS, certificando-nos que a ligação de AuNp com BSA ocorre com maior rendimento quando há adição do mesmo. (HERMANSON, 2013)

A análise de potencial Zeta das amostras reflete a carga efetiva nas partículas, bem como de qualquer camada adsorvida na interface da molécula. Quanto maior o valor de potencial Zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem, partículas com cargas próximas a zero tendem a se atrair e formar agregados. (HUNTER, OTTEWILL e ROWELL, 1981)

O ponto isoelétrico de uma solução tem grande importância na determinação de sua estabilidade, a existência de cargas positivas ou negativas

determina a interação da molécula com o meio aquoso, no ponto isoelétrico existe um equilíbrio entre o número de cargas positivas e negativas, onde as forças de repulsão e as forças de interação da molécula com o solvente são mínimas. O ponto isoelétrico da BSA, em torno de 4.7, justifica que na solução em pH 7 teremos cargas predominantemente negativas. (FUJIMOTO, REIS e PETRI, 2002; NEVES e SOUZA, 2017)

Algumas amostras contendo BSA foram analisadas por potencial Zeta, com a finalidade de comprovar que uma concentração de albumina acima do necessário acaba por prejudicar ou diminuir a estabilidade da solução, este resultado corroborou para a determinação da concentração ideal de BSA nos experimentos futuros, as amostras analisadas estão descritas na TAB.2.

TABELA 2: Resultados de potencial Zeta das amostras A-1, A-4 e A-7 respectivamente.

Potencial Zeta	Concentração final de BSA	Amostra
- 41,5 mV +- 12,2	0,0025 mg/ml	A-1
- 37,0 mV +- 8,9	0,25 mg/ml	A-4
- 30,7 mV +- 12,1	2,5 mg/ml	A-7

A amostra selecionada como concentração padrão para experimentos futuros foi a amostra A-4, com concentração de BSA de 0,25 mg/ml, por apresentar bons resultados de modo geral nas caracterizações aplicadas. (CHITHRANI, GHAZANI e CHAN, 2006)

5.2. Modificação das nanopartículas de ^{197}Au com radiação gama

Na segunda etapa da pesquisa realizou-se uma nova síntese de AuNps obedecendo aos mesmos procedimentos citados anteriormente, foram separadas amostras com a mesma concentração de BSA (0,25mg/ml) e submetidas a

diferentes doses de radiação gama (γ), na TAB.3 podemos verificar a classificação das amostras e doses aplicadas.

TABELA 3: Dose de radiação gama aplicada e classificação das amostras respectivamente.

Dose de radiação Gama aplicada	Nome da amostra
Não irradiada	G-0
0,1 kGy	G-1
0,25 kGy	G-2
0,5 kGy	G-3
1 kGy	G-4
2,5 kGy	G-5
5 kGy	G-6
10 kGy	G-7

Radiações ionizantes como os raios gama causam a radiólise da água. Seus produtos são agentes redutores ou oxidantes como os radicais hidroxila, que em proteínas celulares podem causar degradação pelas proteases e peptidases intracelulares, e prejudicar subsequentemente o DNA da molécula. (DAVIES e DELSIGNORE, 1987)

A espectroscopia de fluorescência trata-se de uma técnica baseada na emissão de radiação eletromagnética devido a transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menos energia, o espectro de excitação da fluorescência reflete características de absorção da radiação correspondente às transições eletrônicas, já o espectro de emissão espelha as transições que ocorrem entre o estado eletrônico singleto de mais baixa energia e o estado fundamental. (ITO, 1994)

Antes de retornar ao seu estado fundamental, o elétron permanece em um estado excitado por um tempo de ordem 10^{-9} segundos, neste tempo a

molécula excitada interage com o meio, tornando a emissão de fluorescência um processo dependente das características do meio em que ela se encontra. (ITO, 1994)

Os fluoróforos e cromóforos em moléculas de interesse biológico apresentam fluorescência quando excitadas na região do UV-Visível ou do ultravioleta próximo, esses grupos absorvem luz (energia) de um comprimento de onda em uma região determinada, que posteriormente é emitida num comprimento de onda superior (ou seja, com menor energia). (PAWLAK, SKRZYPCZAK e BIALEK-BYLKA, 2011)

A Espectroscopia de fluorescência foi aplicada às amostras com o intuito de detectar alterações causadas pela radiação nos cromóforos como o triptofano presentes em proteínas. Primeiramente podemos analisar na FIG.18 o espectro de uma solução padrão de BSA em comparação com uma amostra de AuNp (^{197}Au) ligada à BSA, sem submissão à radiação gama.

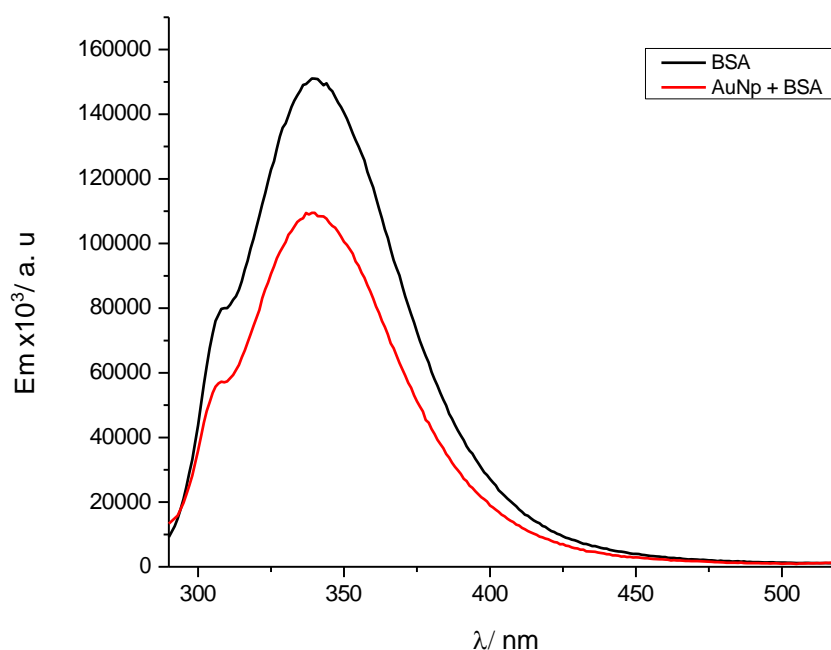


FIGURA 17: Espectros de fluorescência de uma solução padrão de BSA comparada a uma amostra de AuNp+BSA. Análise realizada em excitação de 270 nm e emissão em 290 à 520 nm.

Os resíduos de triptofano presentes em proteínas como a BSA provocam a emissão de fluorescência em comprimentos de onda de 325 – 350nm

variando com a temperatura da amostra, pH da solução entre outros. (DEMCHENKO, 1988) Ao ligar-se à superfície das AuNps ocorre uma diminuição da fluorescência devido ao fenômeno intitulado de transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET), havendo uma transferência de fluorescência entre os cromóforos mais próximos à superfície das AuNps. Este resultado pode ser observado e confirmado no espectro acima (FIG.17), a proteína a princípio não sofreu alterações por nenhum agente químico ou físico, já na amostra em que é adicionado a AuNp podemos verificar uma redução na emissão de fluorescência pela interação da BSA com a superfície do ouro nanoparticulado. (TEALE e WEBER, 1957)

Na FIG.18 temos os espectros de fluorescência das amostras G-0 à G-7, com igual concentração de BSA (0,25 mg/ml) e irradiadas em diferentes doses como observado anteriormente na TAB.3, as leituras no espectrofluorímetro foram realizadas com excitação das amostras em 270 nm e emissão em 290 – 520 nm.

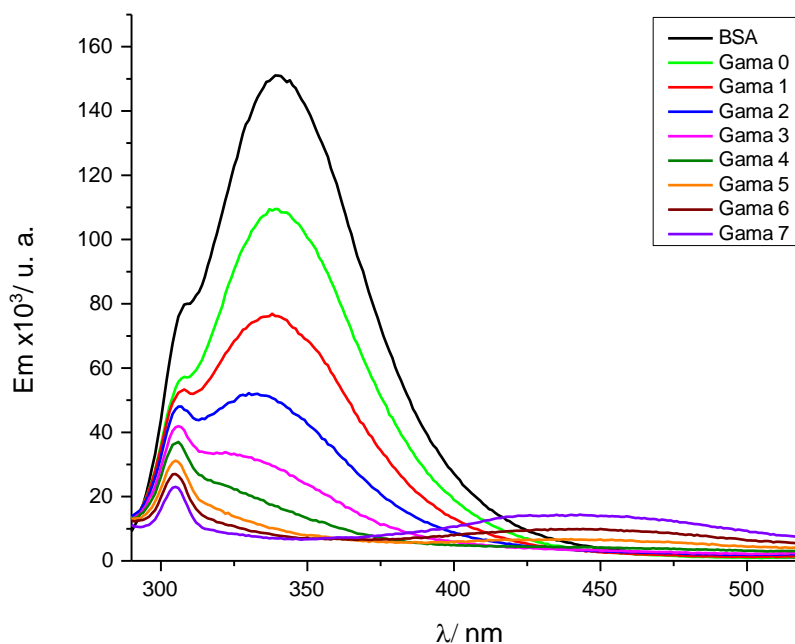


FIGURA 18: Espectros de fluorescência das amostras G-0 à G-7. Análise realizada em excitação de 270 nm e emissão em 290 à 520 nm. Evidenciando a presença de resíduos triptofano característicos da BSA.

Nota-se nesta figura que com o aumento da dose de radiação γ incidente sobre a amostra, temos um efeito de destruição crescente dos resíduos

de triptofano presentes na BSA. O aumento da dose de radiação neutralizou a intensidade de emissão da proteína do soro bovino, causando a interrupção da estrutura ordenada das moléculas de BSA, bem como a degradação das cadeias polipeptídicas devido aos radicais oxidantes gerados pela radiólise da água. (GABER, 2005)

5.3. Síntese de nanopartículas de ^{198}Au

Na terceira etapa deste projeto foi realizada uma síntese de AuNp com procedimento padrão como citado nos itens anteriores, porém, a folha de ouro de alta pureza que dá início ao processo de síntese, foi submetida à radiação nuclear em reator IEA-R1 por 29 horas em fluxo de $4,5 \times 10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, originando o ^{198}Au .

A exposição da folha de ouro à fonte de ^{238}U presente no reator é realizada pelo armazenamento da amostra em um cilindro de alumínio tampado com solda metálica.

A síntese das AuNps com ouro 198 foi realizada em capela apropriada sob a supervisão da equipe de radioproteção do Centro de Radiofarmácia do IPEN, a atividade do ^{198}Au na realização do experimento foi de aproximadamente 0,5 mSv/h dentro da blindagem de chumbo.

A análise do espectro gama da amostra apresentada na FIG.19, demonstra a presença de apenas um pico, que é predominante devido ao decaimento do ouro a mercúrio, confirmando a pureza do material utilizado.

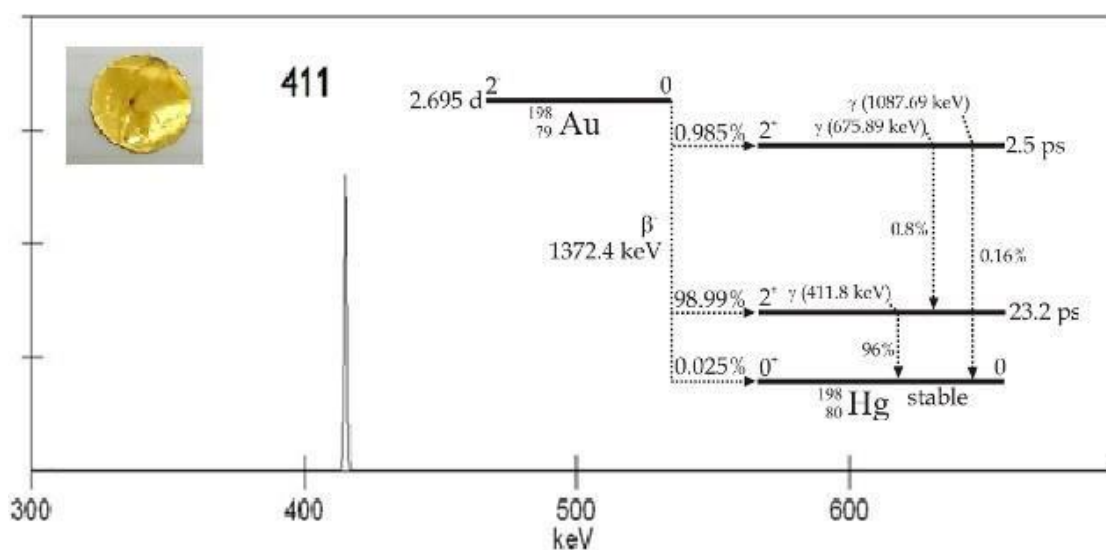


FIGURA 19: Espectro gama da amostra de ouro com pico em 411 keV, inserido folha de ouro e esquema de decaimento do ^{198}Au .

As amostras foram sintetizadas, ajustadas em pH 7 e modificadas com 3MPA seguindo aos mesmos procedimentos citados anteriormente. A separação de amostras foi realizada conforme descrição na TAB 4.

TABELA 4: Classificação e composição das amostras sintetizadas com ^{198}Au .

Composição da amostra	Nome das amostras
100% ^{198}Au	198-A
100% ^{198}Au BSA 0,25 mg/ml	198-B
20% ^{198}Au 80% ^{197}Au	197/198-A
20% ^{198}Au 80% ^{197}Au BSA 0,25 mg/ml	197/198-B

As amostras 198-A e 198-B foram submetidas à análise de

cromatografia ascendente em papel. Para a fase estacionária (suporte) foram utilizadas fitas de papel Whatman 3MM (1x10cm) e fitas de ITLC-SG, fibra de vidro (1x10cm) e solução de NaCl 0,9% como solvente (fase móvel).

Uma gota de cada amostra foi semeada na origem das fitas (na distância de 1,5cm da margem inferior da fita em triplicata, as fitas foram colocadas em cubas previamente preparadas com o solvente. Ao final da corrida de 10 cm, as fitas foram retiradas e secas em estufa, em seguida, foram cortadas em segmentos de 1cm e colocadas em tubos de contagens para determinação da atividade num contador de radiação gama. As fitas utilizadas no sistema cromatográfico podem ser verificadas na FIG. 20.

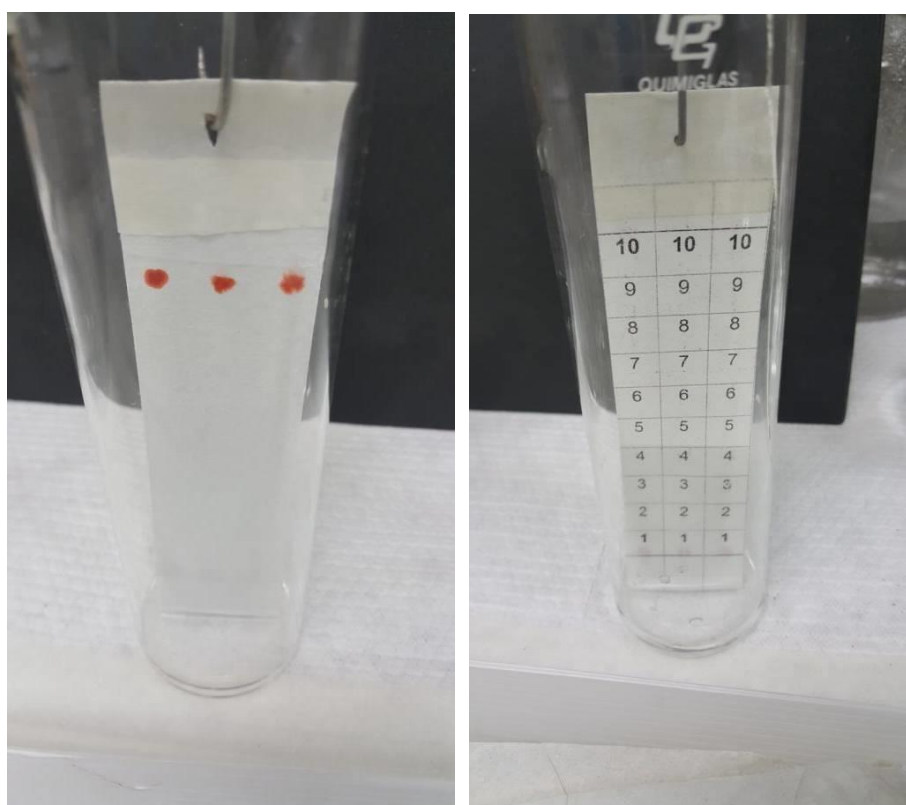


FIGURA 20: Análise cromatográfica em papel com as fitas Whatman e ITLC-SG respectivamente.

A análise de pureza radioquímica consiste na determinação da porcentagem do radionuclídeo livre presente na amostra. (CAMARGO, 2007) Muitos compostos decompõem-se por ação da radiação emitida pelo próprio radionuclídeo e este efeito aumenta quanto maior for a atividade específica do composto. (OLIVEIRA, SANTOS, *et al.*, 2006) Os resultados da análise cromatográfica estão descritos na TAB.5.

TABELA 5: Resultados de cromatografia com fitas de papel Whatman e fitas de ITLC-SG, expressando a porcentagem de pureza radioquímica em cada amostra.

Porcentagem de pureza (média da triplicata)		Amostra
ITLC-SG	Whatman	-
94,8 %	93,6 %	198-A
0,25 %	0,16 %	198-B

Conforme esperado, a pureza radioquímica da amostra 198-A apresenta elevados valores em ambas as fitas, esse resultado deve-se ao fato da amostra se tratar apenas de nanopartículas de ouro sem ligação ou conjugação com outras moléculas, tratam-se de AuNps livres.

Já no caso da amostra 198-B temos a inversão dos resultados e um grau baixíssimo de pureza radioquímica, o que ratifica a conjugação da AuNp com a BSA adicionada ao sistema, reduzindo assim o valor de Au livre na amostra.

Após 37 dias em decaimento as amostras foram liberadas pela radioproteção para realização das caracterizações padronizadas para este estudo. O primeiro indicio do sucesso na obtenção das nanopartículas com ^{198}Au foi a cor vermelha característica de AuNps, (TURKEVICH, 1985) conforme pode ser verificado na FIG.21.



FIGURA 21: Amostras sintetizadas com 100% de ^{198}Au (A e B-198) e amostras sintetizadas com 20% de ^{198}Au (A e B-197/198).

A espectroscopia em UV-Vis apresentada nas FIG. 22 e 23 corrobora com os resultados esperados e apresenta deslocamento na banda de ressonância de plasmon de superfície de 524 nm para 528 nm em amostras contendo ^{198}Au (FIG.22) e deslocamento de 523 nm para 528 nm em amostras com conjugação de ^{197}Au e ^{198}Au (FIG.23).

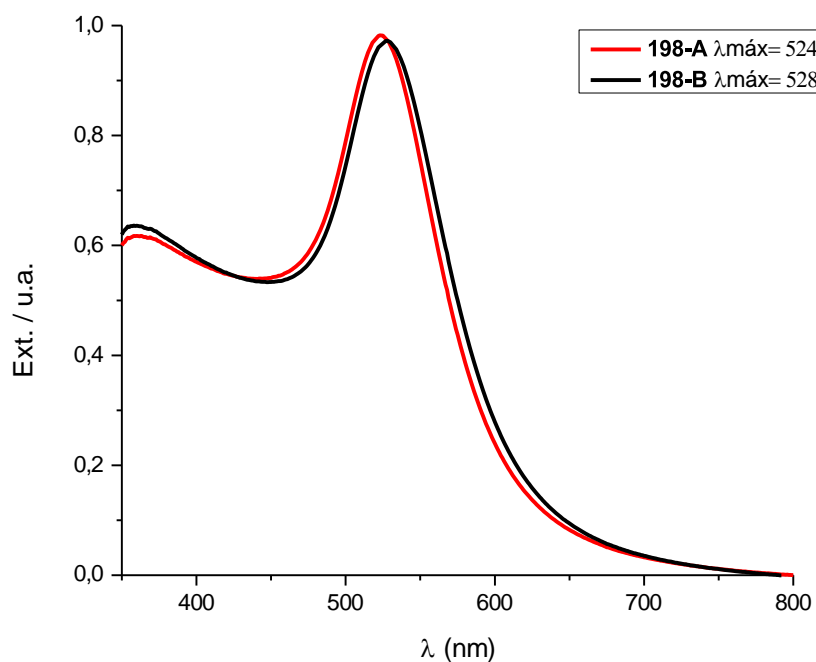


FIGURA 22: Espectros de extinção em UV-Vis das amostras 198-A e 198-B com deslocamento da banda de 524 nm para 528 nm.

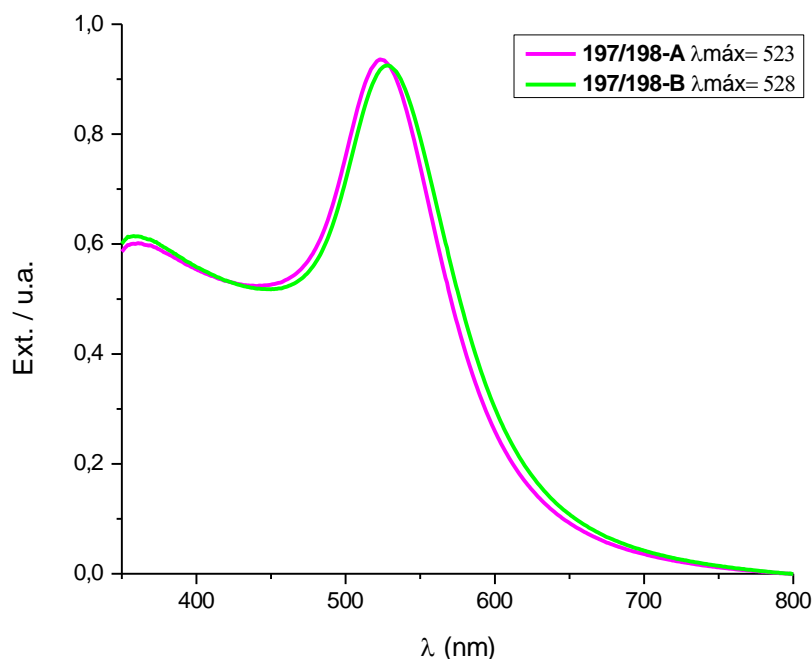


FIGURA 23: Espectros de extinção em UV-Vis das amostras 197/198-A e 197/198-B com deslocamento da banda de 523 nm para 528 nm.

Conforme citado anteriormente, o deslocamento do máximo da banda de ressonância de plasmon esta diretamente relacionada à alteração da superfície das AuNps, o que pode ser confirmado nos espectros de extinção das amostras ativas com e sem BSA. (PERRAULT e CHAN, 2010)

Na FIG.24 é realizada a comparação entre medidas de DLS das amostras contendo apenas AuNps e amostras de AuNp + BSA (0,25 mg/ml) em três diferentes situações abordadas neste estudo. Num primeiro momento temos a análise das amostras feitas com ^{197}Au , as AuNps isoladas medem por volta de 29,4 nm, e as AuNps conjugadas com BSA medem 52,7 nm. Na sequência temos as amostras feitas totalmente com ^{198}Au , AuNps medindo 35,2 nm e AuNps+BSA medindo 43,2 nm, e por último a medida das amostras realizadas com apenas 20% de ^{198}Au e 80% de ^{197}Au apresentam pouca diferença em relação àquelas totalmente radioativas com AuNps de 33,7 nm e AuNps+BSA de 40,8 nm.

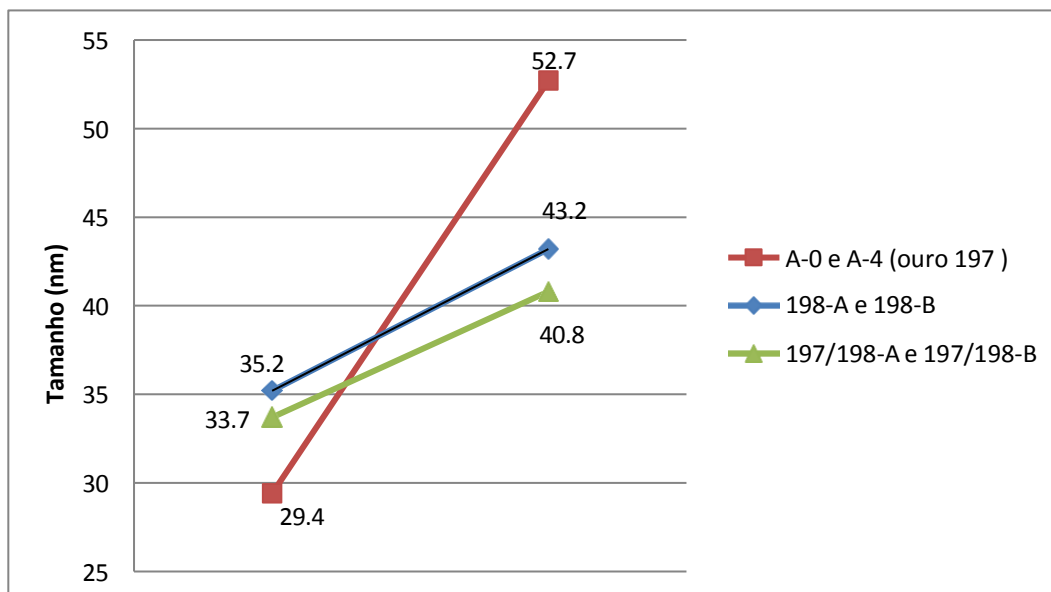


FIGURA 24: Análise comparativa obtida em DLS das amostras A-0 e A-4 sintetizadas com ^{197}Au , amostras 198-A e 198-B sintetizadas com 100% de ^{198}Au e amostras 197/198-A e 197/198-B sintetizadas com 20% de ^{198}Au .

De acordo com a FIG.24, a primeira medida das amostras contendo somente AuNps traz indicativos de nanopartículas com tamanhos parecidos, àquelas contendo ouro radioativo um pouco maiores, não sendo estas diferenças muito significativas. A medida de amostras conjugadas com BSA traz um cenário bem diferente, onde as amostras radioativas apresentam tamanho bem menor do que no primeiro caso. Esse resultado pode indicar a destruição mesmo que parcial da BSA causada pela radiação.

Para determinação do grau de danos causados em biomoléculas como a BSA pela radiação que o ouro emite, foram realizadas medidas de espectroscopia eletrônica UV-Vis e espectroscopia de fluorescência das amostras 197/198-B e 198-B.

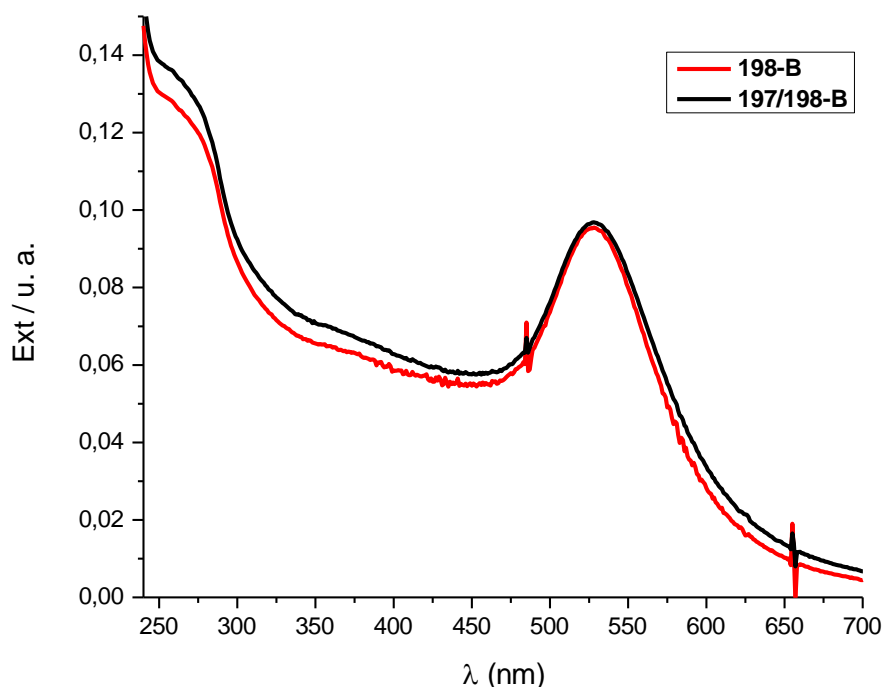


FIGURA 25: Espectros em UV-Vis das amostras 197/198-B e 198-B, apresentando banda característica de BSA em torno de 280 nm e banda de ressonância de plasmon de AuNps em torno de 530 nm.

Os espectros UV-Vis, na FIG.25, apresentam banda característica de ressonância de plásmons das AuNps por volta de 530 nm e a banda característica de absorção dos cromóforos presentes na BSA, em torno de 280 nm.

Os cromóforos presentes na BSA apresentam uma diminuição quando em amostras que utilizaram-se exclusivamente do ^{198}Au , o que demonstra destruição de parte dos resíduos de triptofano da BSA quando uma dose maior de radiação incide sobre a amostra, no entanto mesmo na amostra mais radioativa os cromóforos não foram completamente destruídos.

Os resultados de espectroscopia de fluorescência foram obtidos com excitação das amostras em 270 nm e Emissão em 290 – 520 nm e os resultados podem ser verificados na FIG.26.

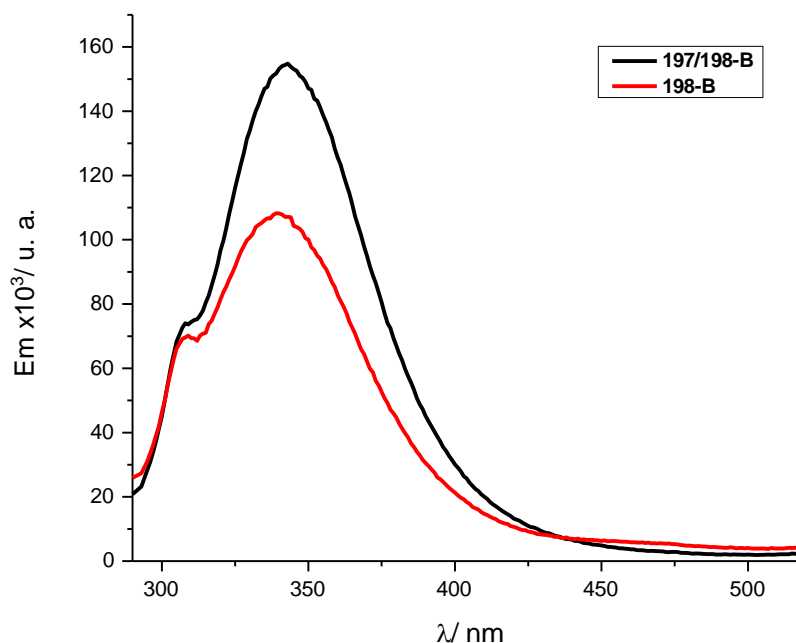


FIGURA 26: Espectros de fluorescência das amostras B-197/198 e B-198. Análise realizada em excitação de 270 nm e emissão em 290 à 520 nm. Evidenciando a diminuição de emissão dos resíduos triptofano característicos da BSA na amostra sintetizada com 100% de ¹⁹⁸Au.

A amostra sintetizada apenas com ¹⁹⁸Au apresenta maior efeito de destruição nos resíduos de triptofano presentes na BSA, este indicativo ratifica a idéia de que quanto maior a radiação incidente, maior será a possibilidade de degradação da proteína. Porém mesmo na amostra B-198 podemos verificar que a degradação dos cromóforos da BSA foi apenas parcial, mantendo preservada boa parte da albumina adicionada à amostra.

6. CONCLUSÃO

Conseguiu-se, modificando um método clássico (Método Turkevich/Frens), sintetizar nanopartículas de ouro a partir de uma folha de ouro em pureza maior que 99,9%, substituindo a utilização do sal de ouro. Esse método, que utiliza-se da oxidação por água Régia, seguida de uma remoção do excesso de ácido por evaporação em pressão reduzida, mostrou-se ideal para o objetivo principal deste trabalho.

A eficácia deste método foi comprovada por diversas técnicas, como espectroscopia no UV-Visível, apresentando a banda de ressonância de plasmon em torno de 520nm, espalhamento de luz dinâmico e por fim microscopia eletrônica de transmissão que demonstram que estas nanopartículas possuem um tamanho ao redor de 14 nm.

Visando futuras aplicações biomédicas dessas nanopartículas realizou-se a conjugação das AuNps à albumina sérica bovina, esta conjugação foi comprovada pelo deslocamento do SPR visualizado em UV-Vis, indicando a modificação da sua superfície, e por medidas de espalhamento de luz dinâmico foi possível observar um considerável aumento do tamanho das partículas após a conjugação de BSA.

Com a irradiação das amostras com radiação gama, constatou-se que os danos causados pela radiação gama aos cromóforos da BSA podem ser utilizados para quantificar a destruição dos grupos cromofóricos, bem como podem ser utilizados para estimar uma dose recebida.

De igual maneira a espectroscopia de fluorescência apontou a destruição presente nas amostras realizadas com ouro ativo (^{198}Au) total ou parcial, consideravelmente maior na solução contendo apenas ^{198}Au , porém por meio desta análise comprovou-se que apesar da já esperada destruição parcial da proteína pela alta radiação emitida pelo ouro ativo, esta não foi totalmente prejudicial, mantendo boa parte dos resíduos de triptofano da proteína intactos.

A proposta inicial deste trabalho foi pactuada com sucesso, foram de fato desenvolvidas nanopartículas de ouro partindo da folha, sintetizadas por citrato de sódio e conjugadas a albumina sérica bovina, apresentando excelentes

resultados que puderam ser comprovados pelas caracterizações aplicadas às amostras, permitindo assim a continuidade deste estudo para as almejadas aplicações futuras em diagnóstico e terapêutica do câncer.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As próximas etapas a serem desenvolvidas partindo deste estudo preliminar onde objetivou-se a síntese diferenciada de AuNps com BSA tem a intenção de enriquecer o trabalho já desenvolvido de modo geral, bem como alçar novos desafios relacionados ao tema.

Para tanto pretende-se realizar novas e repetidas sínteses de AuNps seguindo o mesmo procedimento estabelecido neste estudo e replicar as caracterizações já aplicadas, a fim de comprovar a total reprodutibilidade do padrão adotado.

A realização de Microscopia eletrônica onde seja possível marcar as partículas de BSA também é um objetivo futuro desta pesquisa, de modo que a conjugação também seja comprovada por técnicas de imagem.

Outro ponto importante a ser explorado são diferentes conjugações com as AuNps ou com a BSA em moléculas produzidas por sínteses alternativas, visando aumentar a seletividade de metodologias utilizadas.

A aplicação de técnicas de caracterização inovadoras também deverá ser considerada, o próximo passo do estudo inclui ademais a pesquisa de técnicas que possam enriquecer os dados fornecidos pelas análises das amostras.

Testes *in vitro* e posteriormente *in vivo* já estão previstos para a sequência desta pesquisa, estes testes são de extrema importância e devem ser aplicados assim que as outras etapas do projeto estejam bem definidas e comprovadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI, A. et al. A review on radiation-induced nucleation and growth of colloidal metallic nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, 2013.

BAO, J. et al. Plant Esterase-Chitosan/Gold Nanoparticles-Graphene Nanosheet Composite-Based Biosensor for the Ultrasensitive Detection of Organophosphate Pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 10319-10326, 2015.

BHATTACHARYYA, S. et al. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 2, p. 237-259, 2011.

BRODY, H. Gold. **Nature**, v. 51, p. 495, 2013.

BRUST, M. et al. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, n. 7, p. 801-802, 1994.

CAMARGO, A. C. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato- ^{99m}Tc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio**. Universidade de São Paulo. [S.l.], p. 60. 2007.

CAMMAROSANO, S. A. **Preparação de ouro coloidal radioativo - ¹⁹⁸au: Estudo dos parâmetros que afetam o tamanho das partículas**. Universidade de São Paulo. [S.l.], p. 56. 1979.

CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, v. 26, p. 97-104, 2003.

CHANG, R. **Química Geral - Conceitos Essenciais**. 4. ed. [S.l.]: AMGH, 2007. 720 p.

CHINNATHAMBI, S. et al. Effect of Moderate UVC Irradiation on Bovine Serum Albumin and Complex with Antimetabolite 5-Fluorouracil: Fluorescence Spectroscopic and Molecular Modelling Studies. **International Journal of Spectroscopy**, p. 12, 2015.

CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 662-668, 2006.

COLE, L. E. et al. Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. **Nanomedicine**, v. 10, n. 2, p. 321-341, 2015.

COLMERY, B. H. **Preparation of seeds of radioactive gold-198 and their use in cancer therapy**. Ohio State University. [S.l.], p. 168. 1951.

DAS, R. K.; BORTHAKUR, B. B.; BORA, U. Green synthesis of gold nanoparticles using ethanolic leaf extract of *Centella asiatica*. **Materials Letters**, v. 64, n. 13, p. 1445-1447, 2010.

DAVIES, K. J. A.; DELSIGNORE, M. E. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. 3. Modification of Secondary and Tertiary Structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9908-9913, 1987.

DEMCHENKO, A. P. Red-edge-excitation Fluorescence Spectroscopy of Single-Tryptophan Proteins. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 16, n. 2, p. 121-129, 1988.

DOYEN, M.; BARTIK, K.; BRUYLANTS, G. UV-Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold-citrate aggregates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 399, p. 1-5, 2013.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, n. 157, p. 168-182, 2012.

FAGAIN, C. Understanding and Increasing Protein Stability. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1252, n. 1, p. 1-14, 1995.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FELDHEIM, D. L.; FOSS JR., C. A. **Metal Nanoparticles – Synthesis, Characterization**. New York: Marcel Dekker, 2002.

FRANÇA, C. L.; BARBOZA, K. M. Uso da radiação gama com fonte de cobalto 60 na desinfestação de acervos documentais. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**, v. 3, 2011.

FRICKER, S. P. Medical uses of gold compounds: Past, present and future. **Gold Bulletin**, v. 29, p. 53-60, 1996. ISSN 2.

FUJIMOTO, J.; REIS, E. A.; PETRI, D. F. S. Formação de Multicamadas de Polissacarídeos e Proteína. **Quimica Nova**, v. 25, p. 757-761, 2002.

GABER, M. H. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 203-206, 2005.

GACHARD, E. et al. Radiation-induced and chemical formation of gold clusters. **New Journal of Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1257-1265, 1998.

GANGOPADHYAY, P. et al. **Novel superparamagnetic core(shell) nanoparticles for magnetic targeted drug delivery and hyperthermia treatment**. International Magnetism Conference (Intermag 2005). [S.I.]: IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS. 2005. p. 4194-4196.

GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug**

Delivery Reviews, v. 60, n. 11, p. 1307-1315, 2008.

HAINFELD, J. F. et al. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 977-985, 2008.

HANZIC, N. et al. The synthesis of gold nanoparticles by a citrate-radiolytical method. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 106, p. 77-82, 2015.

HARVEY, B. G. **Química Nuclear - Série de textos básicos de química**. [S.l.]: Editora Edgard Blucher LTDA, 1969. 163 p.

HAUSER, E. A.; LYNN, J. E. **Experiments in colloid chemistry**. [S.l.]: McGraw-Hill book Company, 1940. 18 p.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 3. ed. [S.l.]: Elsevier, 2013. 1146 p.

HUANG, X. H. et al. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. **Nanomedicine**, v. 2, n. 5, p. 681-693, 2007.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 13-28, 2009.

HUNTER, R. J.; OTTEWILL, R. H.; ROWELL, R. L. **Zeta Potential in Colloid Science-Principles and Applications**. [S.l.]: Elsevier, 1981. 386 p.

ITO, A. S. **Espectroscopia de fluorescência no estudo de sistemas de interesse biológico**. Universidade de São Paulo. [S.l.], p. 78. 1994.

JAIN, P. K.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Au nanoparticles target cancer. **Nano Today**, v. 2, n. 1, p. 18-29, 2007.

KATTI, K. V. Renaissance of nuclear medicine through green nanotechnology: functionalized radioactive gold nanoparticles in cancer therapy-my journey from chemistry to saving human lives. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 309, n. 1, p. 5-14, 2016.

KHAN, M. S.; VISHAKANTE, G. D.; SIDDARAMAIAH, H. Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 199, p. 44-58, 2013.

KIRUI, D. K.; REY, D. A.; BATT, C. A. Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. **Nanotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1-10, 2010.

KRATZ, F.; BEYER, U. Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: A review. **Drug Delivery**, v. 5, n. 4, p. 281-299, 1998.

KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical properties of metal clusters**. Berlin: Springer, v. 25, 1995.

LANCU, C. Photothermal therapy of human cancers (PTT) using gold nanoparticles. **Biotechnology, molecular biology and nanomedicine**, v. 1, p. 53 - 60, 2013.

LAYLIN, J. K. Nobel Laureates in chemistry 1901-1992. In: STURCHIO, J. L. **History of modern chemical sciences**. [S.l.]: Chemical Heritage Foundation, 1993. p. 151-156.

LEE, L. A.; WANG, Q. Adaptations of nanoscale viruses and other proteins cages for medical applications. **Nanomedicine; Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 137-149, 2006. ISSN 3.

LI, C. F. et al. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, p. 1-10, 2011.

MESBAHI, A. A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer. **Reports of practical oncology and radiotherapy**, v. 15, p. 176-180, 2010.

NEVES, V. A.; SOUZA, K. A. F. D. Determinação do ponto isoelétrico da caseína. **Experimentos de Bioquímica**, 2017. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/ponto_iseletrico.htm>. Acesso em: 28 Abril 2017.

OKUYAMA, K.; LENGGORO, W.; IWAKI, T. Nanoparticle preparation and its application - A nanotechnology particle project in Japan. In: BADAWY, W.; MOUSSA, W. **International Conference on Mems, Nano and Smart Systems, Proceedings**. [S.l.]: [s.n.], 2004. p. 369-372.

OLIVEIRA, R. et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, 2006. 152 - 165.

PAROLARI, M. C. F. F. **Reações Nucleares: Uma abordagem química**. Universidade de São Paulo. [S.l.], p. 80. 2013.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PAWLAK, K.; SKRZYPCZAK, A.; BIALEK-BYLKA, G. E. Inner Filter Effect in the Fluorescence Emission Spectra of Room Temperature Ionic Liquids With-B-Carotene. **Applications of Ionic Liquids in Science and Technology**, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/applications-of-ionic-liquids-in-science-and-technology/inner-filter-effect-in-the-fluorescence-emission-spectra-of-room-temperature-ionic-liquids-with-carotene>>. Acesso em: 28 abril 2017.

PERRAULT, S. D.; CHAN, W. C. W. Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50-200. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 33, p. 11824-11824, 2010.

PUTNEY, S. D. Encapsulation of proteins for improved delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 548-552, 1998.

RAHMAN, W. N. et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 136-142, 2009.

RUSSEL, P. J. Four levels of Protein Structure. **iGenetics**, 2010. Disponível em: <https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-04.html>. Acesso em: 20 Abril 2016.

SIERRA-RODERO, M.; FERNANDEZ-ROMERO, J. M.; GOMEZ-HENS, A. Photometric determination of thioglycolic acid in cosmetics by using a stopped-flow reverse flow-injection system and the formation of gold nanoparticles. **Microchemical Journal**, v. 97, n. 2, p. 243-248, 2011.

SONAVANE, G. et al. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 1-10, 2008.

SONI, N.; MARGARSON, M. Albumin. Where are we now? **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 15, p. 61 - 68, 2004.

SPERLING, R. A. et al. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1896-1908, 2008.

TAN, M. X. et al. Fluorescence Spectroscopy Study on the Interaction between Evodiamine and Bovine Serum Albumin. **Journal of Chemistry**, p. 1-6, 2013.

TEALE, F. W. J.; WEBER, G. Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. **Biochemical Journal**, v. 65, n. 3, p. 476-482, 1957.

TIWARI, A. Gum arabic-graft-polyaniline: An electrically active redox biomaterial for sensor applications. **Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and**

Applied Chemistry, v. 44, p. 735-745, 2007.

TOGASHI, D. M. et al. Fluorescence study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn oxide nanoparticles interactions. In: SCHWEITZER, D.; FITZMAURICE, M. **Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine Iv**. [S.l.]: [s.n.], 2007. p. K6281-K6281.

TURKEVICH, J. Colloidal Gold. Part I: Historical and preparative aspects, morphology and structure. **Gold Bull**, v. 18, n. 3, p. 86-91, 1985.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. **Discussions of the Faraday Society**, p. 55, 1951.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. The Formation of Colloidal Gold. **Journal of Physical Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 670-673, 1953.

WALKER, C. R. et al. Generation of Polypeptide-Templated Gold Nanoparticles using Ionizing Radiation. **Langmuir**, v. 29, n. 32, p. 10166-10173, 2013.

WINTER, M. Gold: the essentials. **The University of Sheffield and WebElements Ltd, UK**, 2016. Disponível em: <<https://www.webelements.com/gold/>>. Acesso em: 23 Novembro 2016.

WULANDARI, P. et al. Characterization of citrates on gold and silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 438, p. 244-248, 2015.

XIANG, C. L. et al. Sensitive electrochemical detection of Salmonella with chitosan-gold nanoparticles composite film. **Talanta**, v. 140, p. 122-127, 2015.

ZHANG, X. D. et al. Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 165-173, 2009.

ZHU, T. et al. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid. **Langmuir**, v. 19, n. 22, p. 9518–9525, 2003.