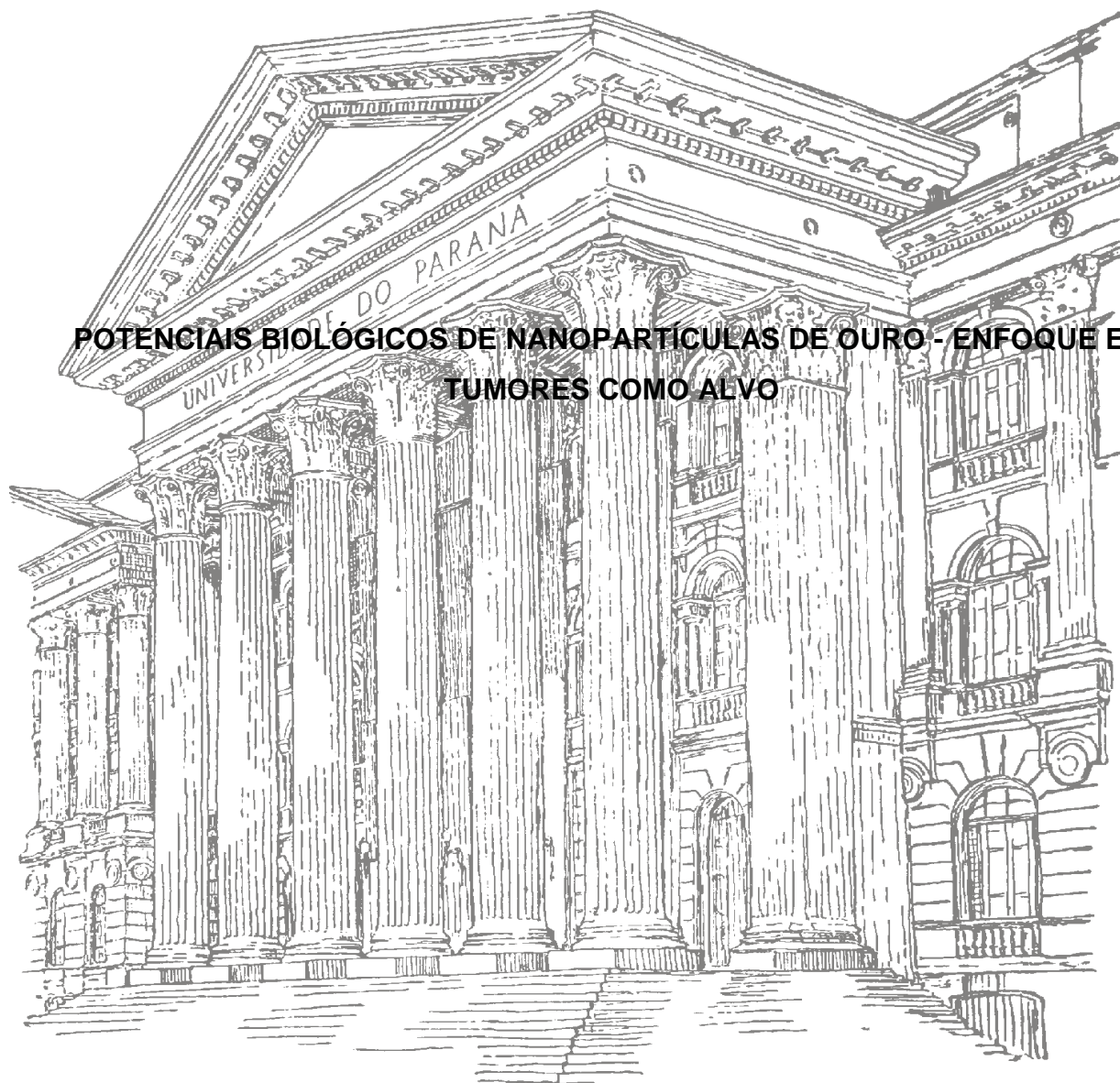


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DOS SANTOS ENGEL



**POTENCIAIS BIOLÓGICOS DE NANOPARTICULAS DE OURO - ENFOQUE EM  
TUMORES COMO ALVO**

CURITIBA

2016

JULIANA DOS SANTOS ENGEL

**POTENCIAIS BIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO - ENFOQUE EM  
TUMORES COMO ALVO**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carolina Camargo de Oliveira  
Coorientadora: Jenifer Pendiuk Gonçalves

CURITIBA

2016

A toda minha família, professores, namorado, amigos e colegas que me auxiliaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho de monografia.

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grata, principalmente, pelo apoio de toda minha família, que sempre esteve junto comigo em todos os momentos de minha graduação.

Agradeço aos amigos e colegas de faculdade que me mostraram o real sentido da amizade e admiração pela profissão de biólogo.

Minha gratidão se estende também a minha professora e orientadora Dra. Carolina Camargo de Oliveira e a coorientadora Jenifer Pendiuk Gonçalves que me auxiliaram imensamente na construção dessa monografia.

Agradeço também pelos ensinamentos sobre síntese de nanopartículas da Heloíse Ribeiro de Barros e pela ajuda da Mary nos experimentos.

Ao Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas da Universidade Federal do Paraná do departamento de Biologia Celular e ao Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces, do departamento de Química, ambos da UFPR.

## RESUMO

O seguinte trabalho de monografia aborda, principalmente, o uso de nanopartículas de ouro no tratamento de câncer. O trabalho é dividido em duas partes, a primeira refere-se à uma revisão bibliográfica sobre nanocompósitos e nanomateriais, câncer e melanoma, tratamentos para melanoma e finalmente, as nanopartículas de ouro com especial atenção em suas características, utilizações e aplicações das mesmas no tratamento de câncer. A segunda parte da monografia tem enfoque em experimentos científicos a fim de determinar a estabilidade de nanocompósitos de nanoesferas de ouro com goma arábica em meio de cultura celular. As duas partes da monografia têm como objetivo descrever um pouco mais sobre o uso da nanotecnologia nos dias de hoje e como nanopartículas podem ser úteis para o tratamento do câncer. Os principais instrumentos de pesquisa utilizados, foram, principalmente, artigos científicos de jornais publicados no NCBI, Google Scholar, SciELO, entre outros. A análise da literatura mostrou que as nanopartículas de ouro, podem ser utilizadas em diferentes aplicações, inclusive em alternativas clínicas para o diagnóstico e tratamento do câncer. Nesse contexto, podem ser utilizadas servindo como agentes principais atacando diretamente um tumor como, por exemplo, nas terapias baseadas em energia, ou ainda como biomarcadores, carreadores de fármacos, RNAs de interferência, entre outros, a fim de potencializar o tratamento e diminuir efeitos colaterais no organismo. De acordo com as análises feitas, houve uma estabilização das nanoesferas de ouro em meio de cultura celular, o qual pretendia simular as condições do meio celular original.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro. Câncer. Melanoma. Nanoesferas de ouro. Nanobastões de ouro. Estabilidade em meio de cultura.

## **ABSTRACT**

The following work covers mainly the use of gold nanoparticles to treat cancer. The work is divided into two parts, the first refers to literature review on nanocomposites and nanomaterials, cancer and melanoma, treatments for melanoma and finally the gold nanoparticles with special attention to their characteristics, uses, and its applications in cancer. The second part of the work has focused on scientific experiments to determine the stability of nanocomposites of gold nanospheres with gum arabic in cell culture medium. The two parts of the work intend to describe the use of nanotechnology nowadays and how nanospheres and nanorods may be useful for cancer treatment. The main research instruments used were mainly scientific journal articles published in NCBI, Google Scholar, SciELO, among others. The analysis of the literature showed that gold nanoparticles can be used in many different applications, including new clinical alternatives for diagnose and treatment of cancer. In this context, they can be used directly to track and destroy tumor, for example in energy-based therapies, or as biomarkers, drug carriers, interfering RNAs carriers, among others, in order to potentiate treatment and decrease side effects to the body. According to the analysis there was a stabilization of gold nanospheres in cell culture medium, which meant to mimic the original cell medium.

**Keywords:** Gold nanoparticles. Cancer. Melanoma. Gold nanospheres. Gold nanorods. Stability in culture medium.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
	PARTE I .....	12
2	OBJETIVOS .....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
4.1.	Nanomateriais e nanocompósitos .....	12
4.2.	Câncer .....	14
4.2.1.	Melanoma .....	16
4.2.1.1.	Tratamento de melanoma .....	18
4.2.1.2.	Novas técnicas de tratamento .....	21
4.3.	Nanopartículas de ouro (AuNPs) .....	25
4.3.1.	Características do ouro .....	25
4.3.2.	Produção e características das AuNPs .....	27
4.3.3.	Funcionalização de AuNPs .....	29
4.3.4.	Utilizações de AuNPs .....	30
4.4.	Aplicações de nanopartículas de ouro, com enfoque em câncer .....	34
	PARTE II .....	41
5	OBJETIVOS .....	42
6	MATERIAL E MÉTODOS .....	42
6.1.	Síntese de nanoesferas de ouro funcionalizadas com goma arábica (GA-AuNPs) .....	42
6.2.	Esterilização das GA-AuNPs e teste de estabilidade em meio de cultura .....	43
6.3.	Lavagem das GA-AuNPs .....	43

6.4.	Síntese de nanobastões de ouro funcionalizados com goma arábica (GA-AuNRs) .....	44
6.5.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	45
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
8	CONCLUSÃO .....	60
	REFERÊNCIAS .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

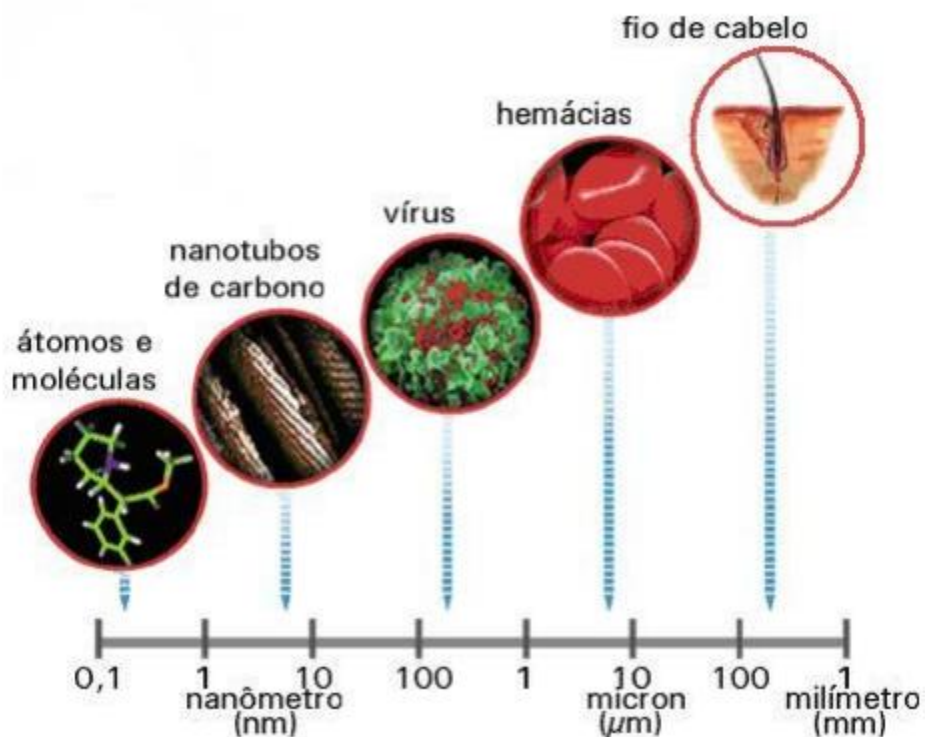
A nanotecnologia é uma ciência em desenvolvimento cada vez mais aceita em grupos de pesquisa ao redor do mundo. Os nanomateriais podem ser caracterizados pelo seu tamanho reduzido na escala nanométrica, possuindo pelo menos uma de suas dimensões com menos de 100 nanômetros. Acredita-se que o uso de nanomateriais em diferentes áreas, como biomédica e de equipamentos eletrônicos, por exemplo, se deve às suas propriedades óticas, magnéticas e elétricas. Dependendo do material utilizado na formação desses nanomateriais, algumas características estarão mais ou menos evidenciadas do que outras. Os nanomateriais podem ser originados de ouro, prata, sílica, carbono, lipossomos, entre outros.

Os conhecimentos na área de nanotecnologia estão sendo cada vez mais aprimorados em prol de seu uso para a população, principalmente no que se refere ao tratamento de doenças. As nanopartículas são descritas em diferentes artigos como uma nova alternativa a ser utilizada clinicamente. No contexto do câncer, podem ser utilizadas tanto como carreadores de fármacos, a fim de potencializar o tratamento e diminuir efeitos colaterais no organismo, quanto como agentes principais atacando diretamente um tumor.

Neste trabalho são enfocados os nanocompósitos de metal, mais especificamente nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas. Esses nanocompósitos podem ser utilizados em diferentes procedimentos, desde bioimagem e monitoramento de células e tecidos, reparação de tecidos, antígenos, até em detecções e fototermólise de células cancerosas e tumores, entre outros. (KHLEBTSOV et al., 2013). As nanopartículas inorgânicas, nesse caso de ouro, podem ser usadas nos procedimentos citados anteriormente, pois apresentam características como tamanho pequeno, que permite o acesso a tecidos e células, além de ser um importante meio de transporte de certos fármacos. (KHAN; VISHAKANTE, 2013). A FIGURA 1 ilustra o tamanho das nanopartículas, que podem ser comparadas a diferentes materiais ou organismos, como átomos e moléculas, vírus, hemácias e fio de

cabelo, reafirmando assim como seu tamanho é um fator positivo e muito útil para diferentes aplicações.

FIGURA 1 – ESCALA DE TAMANHO DE DIFERENTES MATERIAIS E ORGANISMOS



FONTE: GRANADA (2011, p.13) / Prof. Dr. Henrique Toma

Visto que as AuNPs apresentam vasta possibilidade de aplicação biotecnológica, primeiramente foi realizada uma revisão bibliográfica com o intuito de reunir esses artigos e mostrar a importância da nanotecnologia na atualidade e como ela se desenvolveu com o passar dos anos. Já a segunda parte da monografia enfoca a parte prática da síntese de nanoesferas e nanobastões de ouro. Foram realizados experimentos a fim de verificar a estabilidade de nanocompósitos de ouro em meio de cultura celular.

## **PARTE I**

### **2 OBJETIVOS**

Realizar revisão bibliográfica sobre AuNPs, descrevendo principalmente suas aplicações e características, tendo como enfoque a abordagem de novas alternativas de tratamentos para o câncer utilizando essas AuNPs.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Buscas na internet (*world wide web*) foram realizadas a fim de identificar trabalhos relacionados com AuNPs, suas características e aplicações, câncer, melanoma e seus tratamentos.

Para tanto, foram realizadas pesquisas nas bases de dados Medline (Pubmed), Science Direct e Portal da CAPES, e foram selecionados alguns artigos mais relevantes para o tema.

### **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **4.1. Nanomateriais e nanocompósitos**

Nanomateriais são caracterizados por seu tamanho reduzido na escala nanométrica (lembrando que um nanômetro corresponde a um milionésimo de um milímetro), possuindo necessariamente pelo menos uma de suas dimensões com menos de 100 nanômetros. Os nanomateriais têm diferentes propriedades como: ótica, magnética e elétrica, e por isso, tornou-se possível o uso deles na área de pesquisa médica e equipamentos eletrônicos. Nanomateriais de carbono e prata podem ser

encontrados na natureza. Proteínas sanguíneas, assim como lipídios da gordura corporal também podem ser considerados nanomateriais naturais. (ESTADOS UNIDOS. National Institute of Environmental Health Sciences, 2016). Os nanomateriais são utilizados atualmente para técnicas mais precisas e sensíveis, podendo ser aplicados na terapia do câncer, por exemplo, como biomarcadores extremamente sensíveis a essas células. Atualmente, vários são os nanomateriais existentes, como *quantum dots*, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas e nanometálicos, como as AuNPs por exemplo. (CHOI *et al.*, 2010).

Nanocompósitos são compostos híbridos que têm pelo menos uma de suas fases com a medida em nanômetros. As interações entre as fases dos nanocompósitos são ainda mais fortes por acontecerem no nível de nanômetros e devido a maior superfície de contato, sendo relevante pelo aprimoramento das propriedades dos materiais. De acordo com o material de sua matriz, podem ser classificados como nanocompósitos metálicos, de cerâmica, de polímeros, dentre outros. Os elementos e compostos químicos metálicos usados para produzir um nanocompósito precisam passar por diferentes processos específicos, que dependem de qual elemento ou composto está sendo usado. Por exemplo, para a obtenção de nanocompósitos de ferro/óxido de magnésio e tungstênio/cobre é necessário o uso da técnica spray pirólise, enquanto que para compostos de Chumbo/Cobre, Chumbo/Ferro, Tungstênio/Cobre, Nióbio/Cobre, Nióbio/Ferro e Alumínio-Carbono60 o processo é chamado de infiltração líquida. Os nanocompósitos dos compostos de Prata/Ouro, Ferro/Dióxido de Silício, Ouro/Ferro/Ouro podem ser obtidos através de processos químicos, como o método coloidal e o método Sol-gel. O método coloidal consiste na redução de sais inorgânicos, consolidação do material seco, tratamento térmico e redução óxido seletiva para formar o metal. Para o método Sol-gel é preciso a preparação de duas soluções de micelas dos compostos químicos  $\text{HAuCl}_4$  e  $\text{NaBH}_4$ , utilizando luz ultravioleta, enquanto ocorre a mistura dos elementos, até que a redução do ouro esteja completa. (CAMARGO *et al.*, 2009).

A nanotecnologia está presente nos dias de hoje principalmente na forma de nanomateriais. Richard Feynman, cerca de 60 anos atrás, propôs a possibilidade de

utilização de nanomateriais para aplicações diversas, podendo esses ser utilizados tanto para a pesquisa científica quanto para a produção de produtos diferenciados. (SALATA, 2004). A nanotecnologia possibilita sensibilidade apurada de detecção. Nesse sentido, pode ser utilizada como biomarcador tumoral propiciando uma identificação eficiente, sendo importante, principalmente, para detectar precocemente e obter um diagnóstico correto de câncer. Porém, essa nova tecnologia de detecção precisa ser validada antes de partir para uma aplicação em diagnóstico clínico, devido a riscos relacionados à saúde humana e ao meio ambiente, além da possibilidade de gerar resultados falso-positivos ou negativos. (CHOI *et al.*, 2010).

Antes de revisar as aplicações dos nanomateriais no diagnóstico e tratamento do câncer, segue uma breve revisão sobre as bases celulares da doença.

#### 4.2. Câncer

O câncer é uma das doenças com maior índice de mortalidade no mundo, onde 14 milhões de casos surgiram em 2012 e desses casos, houve 8,2 milhões de mortes. Projeções para 2015 demonstraram que os cânceres que teriam maior ocorrência seriam o câncer de mama, pulmão e brônquios e de próstata. Além disso, os índices de ocorrência de câncer podem aumentar em 50%, chegando a 15 milhões até 2020 (World Health Organization, 2015). Nos últimos 50 anos vários avanços tecnológicos ocorreram com o objetivo de criar um tratamento adequado para o câncer, onde somente células cancerosas fossem atingidas, assim como um aprofundamento no conhecimento dos mecanismos da doença. Porém, para haver o entendimento do mecanismo molecular da doença, muitos estudos precisam ser realizados, assim como novos tratamentos precisam ser melhor avaliados para terem um melhor desempenho. (CONDE, 2015).

Um tumor é resultado de sucessivas mutações genéticas em células normais, que podem conferir novas características a essas células, como crescimento e proliferação celular desenfreada. Alterações nos circuitos de regulação de fisiologia

celular, que tendem a levar ao câncer, podem ser agrupadas em seis diferentes grupos: sinais celulares autossuficientes, fuga da apoptose celular, insensibilidade à sinais anti-crescimento, potencial proliferativo ilimitado, angiogênese e invasão de outros tecidos (metástase). (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O primeiro fator para que uma célula normal seja transformada em célula tumoral é a autossuficiência (produção) de sinais para a proliferação celular, chamados de sinais de crescimento mitogênicos nas células normais, enquanto isso, nas células tumorais esses sinais imitam a mesma função e também têm a capacidade de proliferação sem a necessidade de estimulação externa do ambiente celular. As células tumorais também realizam um processo chamado de estimulação autócrina, onde os sinais estimulam a proliferação celular e quanto mais células, mais sinais são gerados e assim sucessivamente. Alguns exemplos de proliferação tumoral seriam tanto o fator de crescimento tumoral  $\alpha$  por glioblastomas e sarcomas, quanto a produção de fator de crescimento de derivados de plaquetas. Outro fator importante para formação de células cancerosas é a insensibilidade a sinais anti-proliferação que estão presentes em um organismo normal para manter a homeostase tecidual. Esses sinais anti-proliferação agem de forma a pararem o ciclo celular na fase quiescente ( $G_0$ ) ou a induzirem as células a entrarem em estado pós-mitótico. De maneira geral, os cânceres conseguem “nutrir-se” através da ativação da angiogênese, que se trata do mecanismo de criação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos já existentes. Isso porque o crescimento do tumor sólido requer uma quantidade cada vez maior de nutrientes e oxigênio, que muitas vezes extrapola a quantidade disponível da rede vascular circundante. (HANAHAN; WEINBERG, 2000; CLARKE *et al.*, 2014).

As células tumorais também têm a característica de “escapar” da apoptose, que seria um processo de morte celular programada, a qual gera a redução celular, aumento de eosinofilia, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos que são reconhecidos e eliminados pelo sistema imune. Ainda assim, apesar das aquisições de novas características descritas anteriormente sobre a multiplicação celular desenfreada, há um sistema intrínseco que controla essa proliferação, não dependente de sinais célula-célula. Por isso, para que ocorra a formação de um tumor

maligno, alteração nesse sistema também deve ser observada. Finalmente, invasão e metástase são outras características observadas em células tumorais, onde essas células conseguem se desprender da massa de tumor primário e colonizar outro local onde haja mais irrigação e nutrição tumoral. (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O melanoma, um tipo de câncer de pele, apresenta os processos mencionados anteriormente. O tópico a seguir descreverá um pouco mais sobre esse câncer agressivo e, muitas vezes fatal, caso não seja diagnosticado precocemente.

#### 4.2.1. *Melanoma*

Melanócitos são células originadas da crista neural que são capazes de produzir melanina. Essas células podem ser encontradas, principalmente, na epiderme e nos folículos capilares. São as células responsáveis pela pigmentação e fotoproteção na pele, além de serem encontradas também nos olhos, epitélio de mucosas e meninges. (LIN; FISHER, 2007). Os melanócitos passam por diferentes fases de diferenciação, primeiramente a linhagem de melanócitos sofre diferenciação da crista neural, depois migram e proliferam-se em melanoblastos, então, os melanoblastos diferenciam-se em melanócitos. Esses melanócitos irão maturar e proliferar em lugares específicos e após algum tempo irão sofrer morte celular. (CICHOREK *et al.*, 2013).

A transformação nociva de melanócitos gera o câncer de pele conhecido por melanoma, e é ocasionada por subseqüentes mutações somáticas, que desestabilizam as vias sinalizadoras de proliferação celular, crescimento, motilidade, interações com o sistema imune e status de diferenciação, dando origem a diferentes tipos de neoplasias. Os sinais e manchas que estão presentes na pele de muitas pessoas, sejam eles originados pela exposição ao sol ou marcas de nascimento, podem ser identificados como neoplasias benignas, chamando-as de nevos melanocíticos; que quando consideradas malignas, são chamadas de melanoma. As neoplasias melanocíticas podem ser originadas a partir de mutações somáticas que ativam

oncogenes ou desativam genes supressores de tumor. Quando há a formação de neoplasia benigna, significa que a proliferação de melanócitos ficou limitada ao nevo por uma diversidade de fatores, incluindo o comprimento dos telômeros dos cromossomos, fatores secretores, sistema imune e pontos de checagem do ciclo celular. Alguns melanomas não têm relação com estágios precursores de tumores benignos. (BASTIAN, 2014).

Melanoma é bastante agressivo e resistente a uma série de fármacos quimioterápicos. (SCHADENDORF *et al.*, 2015). Os diferentes tipos de melanoma podem ser agrupados, atualmente, em quatro principais subtipos, dependendo de onde são detectados no corpo do indivíduo e de suas variações patogênicas. Além disso, essa classificação baseia-se na observação dos aspectos morfológicos da fase inicial do crescimento (radial) e no local em que o melanoma primário foi encontrado, diferenciando-se em: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligno (MLM) e melanoma lentiginoso acral (MLA). (BASTIAN, 2014). Na FIGURA 2, é possível observar os principais subtipos do melanoma:

FIGURA 2 – PRINCIPAIS SUBTIPOS DE MELANOMA



Na figura acima é possível observar os seguintes tipos de melanoma: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma lentigo maligno (MLM) e melanoma lentiginoso acral (MLA).

FONTE: Adaptado de *Dermatology Information System* (2016) e COSTA (2013).

Segundo Siegel (2014) a estimativa nos Estados Unidos era de que dos 76.100 novos casos, 9.710 mortes pudessem ocorrer em 2014, devido a esse tipo de câncer de pele (melanoma). E, de acordo com Schadendorf (2015) a forma cutânea da doença

é muito encontrada no ocidente, causando a maioria das mortes relacionadas ao câncer de pele (75%). Entre os fatores de risco mais comuns para essa doença, incluem-se: histórico familiar, verrugas, pele clara, pessoas com a imunidade debilitada e exposição à radiação ultravioleta. O melanoma, assim como outros cânceres, apresenta uma assinatura genética específica, causada principalmente pela exposição ao sol. Além do melanoma cutâneo, há também outras formas da doença identificadas nos olhos e mucosas, com suas assinaturas genéticas diferentes do melanoma cutâneo. De acordo com os riscos apresentados, especialistas descobriram que a exposição intensa e descontínua e as queimaduras de pele ocasionadas pelo sol durante a infância estão entre os maiores fatores de risco. Outro fator importante a ser considerado é que a exposição artificial aos raios ultravioleta, popularmente chamado de bronzeamento artificial, também é muito danosa à saúde das pessoas. (WHITEMAN *et al.*, 2001; SIEGEL *et al.*, 2014; SCHADENDORF *et al.*, 2015).

As diferentes taxas de sobrevivência ao câncer de pele em diferentes regiões no mundo são normalmente associadas e indicadoras dos diferentes níveis de prevenção à doença. Quanto maior o número de programas de prevenção e diagnóstico precoce, juntamente com uma adequada acessibilidade à saúde, maior será a taxa de sobrevivência em determinada região. (SCHADENDORF *et al.*, 2015).

#### 4.2.1.1. Tratamento de melanoma

O primeiro passo para curar um melanoma seria a remoção cirúrgica de tumores iniciais, que são avaliados quanto ao tamanho, forma e profundidade pelo médico responsável. Os métodos Clark e Breslow podem ser utilizados para detectar nível de invasão do tumor. O primeiro método tem uma escala de 1 a 5, onde o primeiro estágio estaria relacionado com uma localização somente na epiderme sem risco de metástase, já no estágio 5 o tumor estaria invadindo o tecido adiposo subcutâneo e sob risco de invadir nódulos linfáticos. O método de Breslow é mais preciso, pois o tumor é avaliado com um micrômetro ocular e analisa as margens do tumor para posterior

remoção cirúrgica ou uma possível dissecação de linfonodo. A avaliação cirúrgica também pode ser feita dividindo os estágios tumorais em I, II e III. O estágio I é limitado ao local de início de proliferação celular, sem metástase. No estágio II, pode haver uma invasão de linfonodos regionais. E no estágio III, o paciente já está sofrendo metástases sistêmicas. Para que a remoção cirúrgica seja bem-sucedida ela precisa ser realizada nos estágios I e II, mesmo assim, acompanhamento médico precisa ser realizado por 10 anos após o procedimento. Quimioterapia sistêmica pode ser aplicada em casos onde a doença está mais avançada, porém, as chances de sobrevivência são mais reduzidas. Outras opções de tratamento estão sendo estudadas e testes clínicos realizados com o objetivo de aumentar a taxa de sobrevivência de pessoas que têm melanoma metastático. (NORVELL; BODURTHA, 1985).

Existem diferentes estratégias que podem ser utilizadas para atingir certos processos em células tumorais, com o objetivo de prevenir seu desenvolvimento. Por exemplo, em células normais, a ligação de fatores de crescimento a receptores de membrana desencadeia a sinalização através da via da MAPK, resultando em proliferação celular. Em melanomas cutâneos, essa importante via metabólica está frequentemente modificada. É comum ocorrer mutação nos genes que codificam para proteínas dessa via (RAS, RAF, MEK1/2 e ERK1/2), as quais são responsáveis pela ativação constitutiva de sinais produzidos normalmente por receptores da membrana celular. A ativação da via de MAPK resulta em regulação da expressão de vários genes envolvidos em processos como proliferação, diferenciação, angiogênese e sobrevivência, através de fosforilação de fatores de transcrição nucleares e, indiretamente, por direcionamento de moléculas sinalizadoras intracelulares. Por isso, há diferentes hipóteses envolvendo essa via metabólica, com o intuito de prevenir a progressão do câncer. O entendimento dessa via de mecanismo molecular também contribuiria para avanços na área de resistência a quimioterápicos. (EVANS *et al.*, 2013).

Atualmente, o fármaco dacarbazina é utilizado na maioria dos tratamentos para melanoma, com uma média de sobrevivência de 6-10 meses para pacientes que tenham melanomas com metástases. Porém, somente 20% desses pacientes com

metástases conseguem alcançar a média de 5 anos de sobrevivência. (DIANZANI *et al.*, 2014). Além da dacarbazina, no caso da quimioterapia, os principais fármacos utilizados são: nitrosoureia, temozolomida, alcaloide de vinca, compostos de platina e taxanos. Já a imunoterapia é uma prática onde se administra citocinas aos pacientes, a fim de estimular o sistema imune para o combate ao câncer. Alguns exemplos de imunoterápicos incluem: interleucinas (IL), IL-2, IL-5, IL-7, IL-21, interferon- $\alpha$ - (INF- $\alpha$ ) e fatores estimulantes formadores de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF). Anticorpos como Ipilimumab (anticorpo humano contra CTLA-4) e Nivolumab (anticorpo anti-PD-1) estão envolvidos com o bloqueio de sinal inibitório de CTLA-4, ativação de células T e linfócitos que infiltram o tumor; e desligamento de resposta de célula T para reduzir uma reação imune exagerada, respectivamente. (RIGON *et al.*, 2015). As terapias combinadas com Ipilimumab e Nivolumab podem gerar mais efeitos colaterais do que uma terapia que use somente um agente. Porém, a média de sobrevida dos pacientes submetidos à terapia combinada mostrou-se maior (1 a 2 anos) comparada aos pacientes sob terapia com apenas um dos agentes. (POSTOW *et al.*, 2015).

Outro tipo de terapia utilizada contra o melanoma é a quimioprevenção, que se trata do uso de agentes sintéticos ou naturais para bloquear o desenvolvimento ou prevenir lesões pré-malignas, presentes na progressão invasiva do câncer. Exemplos de agentes de quimioprevenção, que atuam como antioxidantes, são os carotenoides, vitaminas E e C. Ainda assim, o tratamento mais realizado para melanoma primário é a remoção cirúrgica da lesão. Após a remoção, o tecido é enviado para a análise para identificar o estágio do melanoma, baseando-se na localização (tecido epidérmico ou dérmico) e espessura do mesmo. Quando não é possível a remoção total do melanoma, através da cirurgia, em certos locais, como na região nasofaríngeal, sinusal e regiões orais, se faz necessário o uso de radioterapia para eliminação completa do tumor. (RIGON *et al.*, 2015).

Apesar de certa eficácia, o uso dos tratamentos citados acima pode ocasionar diversos efeitos adversos, como no caso das citocinas, por exemplo, que desencadeiam náusea, dor abdominal, vômito, dermatite, enterocolite, diarreia, constipação, hepatite, vitiligo, endocrinopatias e neuropatias. (RIGON *et al.*, 2015).

Sendo assim, outros tratamentos precisam ser desenvolvidos, com o intuito de aumentar a taxa de sobrevivência e diminuir os efeitos colaterais observados. Pensando nisso, cientistas estão focando em novas tecnologias.

#### 4.2.1.2. Novas técnicas de tratamento

O uso das nanopartículas no tratamento do câncer tem sido estudado. Dentre as novas tecnologias propostas para tratar cânceres de pele como o melanoma são: utilização de nanocarregadores, como polímeros e nanopartículas poliméricas, lipossomos, nanosuspensões e nanoemulsões, nanopartículas lipídicas, nanopartículas à base de carbono, nanopartículas magnéticas (MNPs), AuNPs, nanopartículas modulares (MNIs), nanopartículas ativas de redox, pontos quânticos (QDs) e nanopartículas de sílica (SiNPs). Há também terapias a base de proteína, que podem estar relacionadas à tecnologia de transdução de uma proteína ou até mesmo terapias baseadas em chaperonas Hsps. As terapias biológicas incluem imunoterapias e células tronco. Outras abordagens científicas englobam o tratamento via ácido hialurônico como portador e como ligante, metodologias de ultrassom, eletroporação (EPT), eletroquimioterapia (ECT), microagulhas, terapia por *gene gun*, fototerapias e plasma atmosférico gelado (CAP). (SIMOES et al., 2015). Outra alternativa encontra-se no uso de nanopartículas envolvendo técnicas de RNAs de interferência. Essa opção é bastante promissora pois possibilita a entrega seletiva de pequenos RNAs ou DNA aos tumores. Portanto, de acordo com o conceito apresentado, todos os genes transcritos também poderiam ser atingidos. (DIANZANI et al., 2014).

Uma alternativa moderna aos tratamentos abordados é o sistema de entrega de drogas. A nanotecnologia empregada na entrega de drogas está relacionada a maior eficácia do agente antineoplásico, gerada pela utilização de nanopartícula. O uso de nanopartículas inclui benefícios como: podem ser produzidas a partir de diferentes métodos de preparação, a superfície pode ser modificada, proporciona estabilidade alta ao fármaco, moléculas hidrofílicas e lipofílicas podem ser agregadas e possibilidade de

direcionamento e liberação controlada da droga. Porém, há também os efeitos negativos do uso de nanopartículas, como: capacidade reduzida de carregamento da droga, efeitos toxicológicos precisam ser mais profundamente estudados, a produção ainda não pode ser feita em larga escala e a ocorrência de problemas de estabilidade durante o armazenamento. (RIGON *et al.*, 2015). A utilização de AuNPs que mostram uma entrega efetiva de drogas, como o quimioterápico doxorubicina para o tratamento de linhagens celulares de melanoma também vem sendo utilizada. Além disso, a aplicação dessa técnica apresenta fatores a serem considerados, como a baixa irritação na pele, maior proteção à droga encapsulada, melhor solubilidade de drogas pouco hidrossolúveis, maior capacidade de penetração de drogas antitumorais na pele e aumento da meia-vida do fármaco, pois assim a droga teria mais tempo e biodisponibilidade para atingir células tumorais. As nanopartículas também já foram usadas em experimentos que combinavam nanopartículas e imunoterápicos, com o objetivo de diminuir efeitos colaterais no organismo. (DIANZANI *et al.*, 2014).

Os nanofármacos estão em desenvolvimento atualmente, visando atingir cânceres. A primeira geração de nanofármacos anticâncer foi produzida utilizando o método passivo (EPR – permeabilidade aumentada e retenção) de entrega a tumores. O conceito de efeito de EPR pode ser descrito como a diferenciação entre um tecido normal e um tumoral, envolvendo defeitos patofisiológicos e anatômicos da vasculatura tumoral. Deste modo, conhecimentos adquiridos sobre esses defeitos auxiliariam na busca de novos nanofármacos. (GREISH, 2007). As drogas Doxil® e Abraxane são alguns exemplos disso, e foram aprovadas pelo FDA e o agente diagnóstico como o SPION (nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro) está em processo de ensaio clínico. (ZAMBONI *et al.*, 2012).

Aparentemente, quanto mais uma nanopartícula circula no sangue, maiores são as chances dela conseguir atingir a vasculatura tumoral e criar acumulação no local. O tamanho das nanopartículas também foi estudado, pois nanopartículas pequenas, como nanopartículas medindo entre 5-10 nm, são retiradas da circulação por filtração renal. Com o aumento do tamanho das nanopartículas, os locais de acumulação são, principalmente, o fígado e baço. Em relação às AuNPs com polietilenoglicol (PEG) com

tamanho entre 20-90 nm, as que têm maior taxa de circulação no sangue são as que apresentam um tamanho aproximado de 60 nm (TOY *et al.*, 2014). E, segundo Chithrani (2006), as células absorvem mais facilmente nanopartículas de ouro com a média de diâmetro de 50 nm, para fazer a descoberta, outras nanopartículas esféricas e em bastões foram utilizadas com os tamanhos de 14, 30, 50, 74 e 100 nm.

A nanotecnologia é uma boa candidata para combater a resistência a quimioterápicos, pois as nanopartículas têm a capacidade de carregar componentes genéticos e farmacológicos ao mesmo tempo, inibindo o crescimento do melanoma e ajudando a combater a resistência do corpo às drogas administradas via nanopartículas. (EVANS *et al.*, 2013). Por isso, o uso da nanotecnologia em inibidores multialvos vem sendo estudada minuciosamente. Essa forma de tratamento tende a ser mais eficaz, pois não atinge somente um alvo, considerando que o câncer é uma doença com diversos fatores. Além disso, essa terapia visa prevenção da resistência à certos medicamentos. Dois tipos predominantes de inibidores multialvos são conhecidos: inibidor de droga único, que afetaria diversas vias metabólicas ao mesmo tempo; e inibidores multidrogas, ou uma combinação de agentes, sendo que os mesmos inibiriam várias vias metabólicas. O uso de nanotecnologia para a entrega de drogas é importante, pois, é preciso que os inibidores multialvos se acumulem na vasculatura do tumor, minimizando os efeitos colaterais e aumentando a eficácia da droga. Uma droga considerada monoterápica que teve sucesso em tratamentos de câncer foi a Zelboraf, usada para tratar melanomas mais avançados. Porém, o problema da droga Zelboraf é que a mesma atingia uma única via metabólica, facilitando a ocorrência de resistência à droga, pois anormalidades multi-gênicas das células tumorais puderam superar a ação dos elementos presentes no fármaco. Por isso, o fármaco Zelboraf passou a ser substituído por outros inibidores multialvos, para evitar resistência. (GOWDA *et al.*, 2013). No entanto, um exemplo de agente que pode ser carregado por nanopartículas e que atinge múltiplos processos ao mesmo tempo é o Vemurafenib, o qual atinge melanomas com a mutação <sup>v600E</sup>B-Raf, ajudando a prevenir eventuais resistências ao fármaco. Em indivíduos que apresentaram a proteína <sup>v600E</sup>B-

Raf houve regressão tumoral de até 80% nos primeiros dois meses do tratamento. (SINGH *et al.*, 2012).

Terapias baseadas em energia têm utilizado nanotecnologia, especialmente no tratamento de câncer. Podemos citar como terapias baseadas em energia: campo magnético alternado, fotodinâmica, microondas, frequência de rádio (RF), ultrassom focado em alta intensidade (HIFU) e crioblação. Uma vantagem desses métodos é a destruição mais localizada de células cancerosas, diminuindo conseqüentemente efeitos colaterais sistêmicos e infecções. As terapias baseadas em energia são realizadas utilizando-se temperatura aplicada na área delimitada de tratamento, visando eliminar as células tumorais. Esse procedimento é feito através de uma pequena incisão onde a sonda é inserida ou focando principalmente nas fontes externas de altas energias. Geralmente, as nanopartículas são administradas concomitantemente com técnicas de ablação e podem ser inseridas diretamente em uma região afetada por tumor ou por via sistêmica. Além disso, essas técnicas de ablação termal podem ser divididas em dano por aquecimento (hipertermia) com temperatura maior que 43°C, ou dano por resfriamento (criotermia) com temperaturas abaixo de -20°C. O resultado obtido por essa técnica é altamente dependente da temperatura e do tempo que a mesma é aplicada. Na técnica de dano por aquecimento é possível observar desnaturaçãõ de proteínas, injúrias vasculares e ruptura de membrana celular, enquanto que na técnica de dano por resfriamento ocorre um maior dano mecânico pela formação de gelo, isquemia devido à dano vascular, desidrataçãõ celular e resposta imunológica pós-tratamento. Porém, as ablações termais também têm alguns problemas a serem considerados, como possíveis distribuições desiguais de temperatura e difícil visualizaçãõ durante o procedimento. (GILSTRAP *et al.*, 2011).

Com o aumento de estudos na área de nanotecnologia foi possível obter uma resolução maior da área de tratamento com ablações termais, visualizaçãõ tumoral, além de aumentar a eficácia da terapia. Os métodos mais utilizados para aumentar a eficácia dos tratamentos de ablaçãõ baseados em energia foram a introduçãõ de nanopartículas locais ou sistêmicas. Nanotubos de carbono, nanopartículas de óxido de ferro e nanoconchas de ouro mostraram-se de grande utilidade para o uso

concomitante com terapias de aquecimento, pois as nanopartículas absorvem a energia irradiada. Além disso, o uso de nanopartículas no diagnóstico possibilita a visualização do tumor através de métodos não invasivos como a ressonância magnética (MRI) e tomografia computadorizada (CT), auxiliando na escolha do melhor tratamento para determinado câncer. (GILSTRAP *et al.*, 2011).

A seguir haverá uma descrição mais detalhada das AuNPs e suas aplicações em tratamentos de cânceres.

### 4.3. Nanopartículas de ouro (AuNPs)

#### 4.3.1. Características do ouro

O ouro é classificado na tabela periódica como um metal nobre, do grupo B1 e número atômico 197. Pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação, refletindo em diferentes níveis de reatividade e estabilidade em relação a outros elementos químicos. Esse metal nobre pode ser detectado em ínfimas frações nos tecidos humanos, concentração sanguínea, cabelo, pele e unhas. (THAKOR *et al.*, 2011).

O elemento químico e o material ouro vêm sendo usados há muitos séculos e uma das características que mais impressiona as pessoas é a sua beleza em “manter o lustre” por longos anos. Para químicos, o ouro que antes era considerado um elemento pouco atrativo e com poucas oportunidades de utilização, por ser na maioria das vezes quimicamente inerte, hoje é considerado fascinante pelo fato de poder ser usado em nanoescala para catálises e formação de materiais. (HUTCHINGS *et al.*, 2008).

Em 2.500 a.C o ouro já era utilizado medicinalmente nas culturas ancestrais chinesas e egípcias. A biodisponibilidade no organismo depende essencialmente da rota de administração adotada para o tratamento. As características presentes no ouro

que é administrado oralmente são diferentes das características do ouro que será injetado via solução aquosa. Isso ocorre devido ao fato de que o ouro administrado oralmente precisa ser ingerido e absorvido pelo trato gastrointestinal e para isso ocorrer eficazmente ele precisa ser lipossolúvel. Essa diferença entre solubilidades é importante para os aspectos físico-químicos, toxicológicos e farmacocinéticos do ouro. O ouro de reatividade (0), reatividade sendo a tendência de doar elétrons (logo, uma maior tendência de doar elétrons, torna o elemento mais reativo) pode ser utilizado em jóias, próteses e por ter baixa toxicidade é usado principalmente como veículo para terapia de genes. O metal nobre de reatividade (I) serve para o tratamento de doenças através de preparações orais e injetáveis, os efeitos adversos podem variar e tanto reações de hipersensibilidade comuns quanto reações de pele mais raras podem aparecer. Diarreia pode ser notada como efeito adverso ao uso de preparações orais contendo ouro. Além disso, em casos raros, o ouro pode ser encontrado nos rins, causando nefrotoxicidade, devido a injeção com preparação de complexos de ouro. Doenças relacionadas ao sangue, reações inflamatórias no pulmão e neurotoxicidade também já foram observadas e reportadas como efeitos adversos raros. Na gravidez, o uso de complexos de ouro deve ser interrompido, pois o mesmo é teratogênico. (THAKOR *et al.*, 2011).

Outras aplicações do ouro para o tratamento de doenças foram observadas em 1890, quando foi descoberto que os sais de ouro eram tóxicos para os bacilos da tuberculose, esse tratamento com sais de ouro, denominado auroterapia, foi utilizado por cerca de 30 anos. Além disso, a auroterapia mostrou bons resultados no tratamento da artrite reumatoide nos últimos anos. A toxicidade dos sais de ouro apresenta-se através de reações de hipersensibilidade da pele e mucosas, toxicidade renal e depressão da medula óssea. (ANTONOVYCH, 1981).

Apesar das nanopartículas serem materiais biotecnológicos muito estudados atualmente, há indícios de que a utilização das mesmas ocorria desde a época romana. Antigamente, suspensões de ouro eram usadas para dar cor a vitrais, por exemplo. Porém, foi na Índia que ocorreu o primeiro uso das nanopartículas metálicas para a medicina. (TAURAN *et al.*, 2013).

#### 4.3.2. Produção e características das AuNPs

Para produção das nanopartículas de ouro, três métodos podem ser utilizados: físico, químico e biológico. O primeiro refere-se à irradiação de microondas, ablação com laser, método sonoquímico, irradiação ultravioleta, indução de radicais, processo termolítico e fotoquímico. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2011). O segundo, é amplamente utilizado e para que o método seja eficaz é necessário que os elementos nobres das nanopartículas passem primeiramente por uma preparação que, usualmente, consiste na redução química de um sal metálico ( $\text{HAuCl}_4$ ) na presença de agentes estabilizadores (citrato de sódio), sob um ponto de ebulição, a fim de evitar a oxidação e aglomeração na fase reduzida. (TAURAN *et al.*, 2013) ; (DIOS, DE; DÍAZ-GARCÍA, 2010). Além disso, outros métodos químicos utilizam matriz inorgânica como suporte para a geração de nanopartículas. (MUKHERJEE *et al.*, 2002). O último método refere-se à utilização de fungos e bactérias como fábricas de nanopartículas, essa técnica vem chamando a atenção da comunidade científica devido a sua característica “verde”, pois é uma alternativa sustentável à produção tecnológica de nanomateriais. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2011).

As nanopartículas podem então ser classificadas em diferentes tipos de acordo com suas particularidades, são eles: nanobastões, nanoesferas, nanofitas, nanoprismas, nanoestrelas, nanogaiolas, entre outros. (YANG; CUI, 2008). Elas também têm características distintas que são geralmente influenciadas pelo seu formato e tamanho, como: propriedade ótica, química e eletromagnética. (THAKOR *et al.*, 2011). As nanopartículas de ouro apresentam uma forte característica de absorção da luz visível em comprimentos de ondas definidos, dependendo especialmente do tamanho e forma das nanopartículas. (KELLY *et al.*, 2003). Na FIGURA 3 podemos observar diferentes soluções coloidais de AuNPs, onde a cor mais avermelhada está relacionada com tamanho menor das AuNPs, enquanto os diferentes tons de roxo indicam tamanho maior das AuNPs, respectivamente. (COOPER, 2015).

FIGURA 3 – COMPARATIVO ENTRE COR E TAMANHO DE NANOESFERAS



FONTE: COOPER (2015, P.11)

Os nanobastões podem ser produzidos via crescimento mediado por partículas precursoras (*seed*) e não mediado por *seed* (AUSTIN *et al.*, 2014). Além disso, os nanobastões podem ser sintetizados através do método de síntese direta de surfactante brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), ambos os métodos citados produzem uma grande quantidade de nanobastões de ouro homogêneos e podem ser executados em sequência, primeiramente a solução *seed* e, posteriormente, a solução *growth*, fase na qual o surfactante, mencionado anteriormente, direciona o crescimento dos nanobastões. O componente CTAB, no entanto, traz consigo a problemática de ser tóxico, e, para solucionar essa questão pesquisadores encontraram diversas maneiras de funcionalizar a superfície de nanobastões, aumentando sua biocompatibilidade e bio-distribuição. Alguns exemplos de funcionalizações seriam: adição de oligonucleotídeos para transformar os nanobastões em ensaios de nanobastões de ouro (AuNRs), dendrímeros que possam substituir o CTAB tóxico na superfície dos nanobastões, modificação por polietilenoglicol (PEG) em nanobastões e nanopartículas magnéticas para revestir a superfície de AuNRs. (GUI; CUI, 2012). Os nanobastões são geralmente observados, em soluções, nas cores azul ou preto. (THAKOR *et al.*, 2011).

Já as nanoesferas são produzidas em grandes quantidades e por isso são amplamente utilizadas, principalmente, em aplicações técnicas que requerem relativamente alta monodispersão, ou seja, as partículas do sistema coloidal têm

tamanhos semelhantes entre si. A redução do citrato de Turkevich's é considerada um dos principais métodos para gerar as nanoesferas com diâmetros de  $\geq 10$  nm. (AUSTIN *et al.*, 2014). Em relação à sua propriedade ótica, as nanoesferas são usualmente observadas com a cor avermelhada-vinho. (THAKOR *et al.*, 2011).

#### 4.3.3. Funcionalização de AuNPs

De acordo com Delong (2010) a funcionalização das nanopartículas de ouro é essencial para a estabilidade, biocompatibilidade e funcionalidade das mesmas. O principal objetivo da funcionalização seria o de manter certas características das AuNPs e das suas ligações com outras moléculas. Assim sendo, as outras moléculas biológicas devem estar estáveis e capacitadas para conservar o seu bioreconhecimento e as AuNPs devem preservar suas características, como a dispersão de luz e fortes bandas de absorção de plasma. A funcionalização é muito útil em atividades biomédicas, pois com a funcionalização de superfície de AuNPs é possível que elas sejam dirigidas a locais específicos para o tratamento de uma determinada doença ou malignidade. Alguns procedimentos que podem ser apontados como exemplos são: adsorção eletrostática, métodos de afinidade baseada e quimissorção. O primeiro procedimento, adsorção eletrostática, é de fácil realização e refere-se à adsorção de cargas positivas de moléculas de nanopartículas estabilizadas por derivados de ácido carboxílico (ligantes aniônicos). O segundo refere-se à funcionalização de nanopartículas com grupos que oferecem sítios de atração para biomoléculas ligarem-se, assim como as proteínas e oligonucleotídeos também podem ligarem-se mais especificamente. A quimissorção está ligada à tamponação de nanopartículas usufruindo da atração de metais nobres para com moléculas que contenham tiol ou por ligação covalente através de ligantes bifuncionais. (TAURAN *et al.*, 2013). De acordo com (PATRA *et al.*, 2008) além da afinidade com tiol, o ouro também apresenta afinidade com amina, facilitando assim as alterações de superfície

que ocorrem em nanopartículas de ouro por intermédio da ligação entre Au-S e Au-N com quimioterápicos que apresentam essas características.

Essa funcionalização de superfície de nanopartículas abordada anteriormente é necessária para as nanopartículas, visto que, elas precisam ser modificadas para tornarem-se apropriadas para diferentes aplicações. Essas modificações têm como alguns de seus objetivos: estabilizar as nanopartículas em solução para o controle do crescimento de partículas e determinação da forma durante o processo de crescimento; aumento da capacidade de solubilização das nanopartículas em vários solventes; dispor de diferentes grupos funcionais na superfície da partícula; proteção contra oxidação devido a melhoria de características mecânicas e químicas na superfície e redução nos efeitos tóxicos das nanopartículas. (DIOS, DE; DÍAZ-GARCÍA, 2010).

Alguns fatores podem determinar a bioatividade de AuNPs e sua resultante funcionalização. Dentre esses fatores, podemos considerar os mais importantes: a forma, tamanho, carga e densidade do elétron, coordenadas espaciais, pH, concentração e solvente, assim como o método de preparação. É importante observar que a conjugação de diferentes químicos para modificar a superfície de uma nanopartícula gera derivados de AuNPs com objetivos multifuncionais. Além disso, laboratórios de todo o mundo estão empenhados em descobrir se a conjugação e caracterização química, assim como as estratégias de estabilização e entrega de drogas podem ser usadas em vacinas de DNA, moléculas terapêuticas de RNA e siRNA e vacinas de RNA. (DELONG *et al.*, 2010).

A seguir, as utilizações das AuNPs em diferentes áreas serão abordadas, com uma seleção de alguns estudos relevantes na área.

#### 4.3.4. Utilizações de AuNPs

As nanopartículas de ouro têm aplicações em áreas diversas, como biofuncionalização, biodiagnóstico e imagem, além de aplicações clínicas e

terapêuticas. A biofuncionalização é garantida, devido à estabilidade de superfície das nanopartículas de ouro e modificação relativa de superfície, facilitando a ligação e funcionalização entre diferentes moléculas biológicas e orgânicas. Essa modificação relativa de superfície é realizada através de interações covalentes e não covalentes, contribuindo para a substituição de agentes potencialmente tóxicos e uso em alvos biológicos, biosensores e biodiagnósticos. (AUSTIN *et al.*, 2014).

Atualmente, o ouro é o material que tem um maior número de estudos realizados para seu uso em terapias de radiação. (COOPER *et al.*, 2014). Como resultado do uso de AuNPs em radioterapia, é possível citar o exemplo de Chang (2008) em que AuNPs e elétrons de radioterapia foram determinantes para observar um aumento na apoptose de células tumorais em ratos, levando a um prolongamento da vida do animal.

Aplicações biológicas das AuNPs estão sendo correlacionadas ao uso em microscopia ou como veículo para transporte de biomoléculas para células, por exemplo. As aplicações das AuNPs referentes à detecção de imagem e biodiagnóstico são possíveis devido a propriedade óptica das partículas, descoberta por Faraday em 1857 (FARADAY, 1857), que disseminam luz e podem aumentar o desempenho de uma corrente elétrica. Essa detecção se torna viável, pois o tamanho das nanopartículas se assemelha ao de moléculas como o DNA e proteínas, favorecendo a introdução das mesmas em células tumorais ou células-alvo que necessitam ser estudadas. (AUSTIN *et al.*, 2014). Essa capacidade óptica das nanopartículas pode ser facilmente notada, visto que apresentam cores intensas e isso se deve à interação das mesmas com a luz. (TAURAN *et al.*, 2013). E, segundo Bhattacharyya (2011) as AuNPs podem ser utilizadas como agentes ativos que agem em processo celulares e têm características antitumorais e antiangiogênicas. Experimentos realizados por Sokolov e colaboradores (2003) utilizaram plataformas multifuncionais de AuNPs através da ligação de um anticorpo a EGFR (Receptores de fatores de crescimento epidérmico). Esses receptores são identificados em grandes quantidades em células de câncer cervical, indicando que haverá uma detecção maior dessas células tumorais devido à eficiência das nanopartículas observadas através de microscopia confocal. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2011).

As nanopartículas têm a capacidade de transportar diferentes cargas até um determinado alvo, alguns exemplos incluem pequenas moléculas de fármacos, biomoléculas maiores como proteínas, DNA ou RNA. É importante considerar o fato de que a liberação eficiente desses agentes é essencial para uma terapia de sucesso. (GHOSH *et al.*, 2008). A entrega de drogas citotóxicas a lugares específicos no organismo pode ser feita através das AuNPs, já que essas ajudam a reduzir níveis de toxicidade e efeitos adversos. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2011). A liberação de cargas pelas nanopartículas de ouro pode ser ocasionada através de estímulos internos, como glutatona ou pH, ou através estímulos externos como a luz. (GHOSH *et al.*, 2008). PATRA e colaboradores (2008) realizaram um experimento onde se observou a entrega de drogas de baixa dose de gencitabina através do uso de cetuximab atuando como agente-alvo e nanopartículas realizando o papel de veículos de entrega de drogas, o que resultou no bloqueio do crescimento do tumor em um modelo de câncer pancreático. Ademais, há outros alvos que podem ser regulados pelas AuNP, como os receptores de folato, que são expressos em altas quantidades em cânceres, como os de mama, rim, ovário e cérebro.

Além da entrega de drogas, a terapia gênica pode ser realizada por AuNPs devido à sua capacidade de ligação com peptídeos que conseguem atravessar a membrana plasmática da célula. (ARVIZO *et al.*, 2010). De acordo com Nativo e colaboradores (2008) a funcionalidade da membrana pode afetar na compartimentalização subcelular das nanopartículas de ouro. AuNP conjugados com peptídeos podem entrar na célula por endocitose ou diretamente pela membrana plasmática, sendo assim, no caso de endocitose, os conjugados são liberados na matriz celular. (ARVIZO *et al.*, 2010). Tkachenko (2003) conseguiu resultados interessantes, onde as AuNP conjugadas com peptídeos funcionavam melhor no quesito de atingir o núcleo do que peptídeos sem nanopartículas.

Outra aplicação clínica das nanopartículas está ligada a ensaios de ressonância plasmônica de superfície localizada, como nos testes de urina para detectar gravidez. As nanopartículas são mais adequadas do que fluoróforos a esse tipo de ensaio, pois são mais foto-estáveis e absorvem luz visível mais eficientemente. Além disso, também

podem ser utilizados em ensaios que detectam e são capazes de monitorar patógenos provenientes de alimentos. (AUSTIN *et al.*, 2014). As nanopartículas de ouro também são muito úteis no que se refere a técnicas de imagem, como: dois fótons de fluorescência (TPF), imagens de espalhamento de luz, imagem fotoacústica e tomografia (PAT), raio-x de tomografia computadorizada (CT), espectroscopia Raman de superfície melhorada (SERS) e imagem por ressonância magnética (MRI). (CABRAL; BAPTISTA, 2014). O novo ramo da medicina em que as nanopartículas podem ser utilizadas é denominado de teragnóstica, onde diagnóstico e terapia podem ser obtidos. (LIM *et al.*, 2013).

Um exemplo de aplicação terapêutica das nanopartículas seria a utilização das mesmas no tratamento de diversas doenças, uma delas, a artrite reumatoide, foi amplamente investigada quanto à efeitos adversos decorrentes do uso das nanopartículas e evidenciou que há mínimos riscos para o paciente. (THAKOR *et al.*, 2011).

Aplicações terapêuticas utilizando fototermalidade, a qual é responsável pela eliminação de tumores por meio de elevação da temperatura, foram realizados. Os nanobastões são importantes nas áreas de terapia fototérmica, imagiologia molecular e biosensores, além disso, seu uso na distribuição de genes para a terapêutica do câncer é significativo. Alguns benefícios dos nanobastões fazem com que os mesmos sejam mais acessíveis para estudos científicos e utilização em experimentos do que outras formas de nanopartículas de ouro. Dentre os benefícios dos nanobastões, os mais considerados são: o seu uso causa reações moderadas no organismo; variados procedimentos sintéticos podem ser selecionados para o desenvolvimento de nanobastões e há um alto aproveitamento com uma distribuição de tamanhos homogêneos de nanopartículas. (YANG; CUI, 2008). Outro resultado interessante com nanobastões é a combinação de hipertermia induzida, pelos nanobastões, e quimioterapia via cisplatina para atingir células tumorais de ovário (SKOV3) (MEHTALA *et al.*, 2014). Nanobastões já foram unidos à anticorpos de anti-EGFR para serem usados com dispersão próximo ao infravermelho (NIR) com o objetivo de regular danos fototérmicos nas células cancerosas. (HUANG *et al.*, 2006).

O próximo tópico desta monografia terá como principal tema as aplicações dos nanocompósitos de ouro, em diferentes tipos de câncer. A relevância dessa parte se encontra no fato de que com a seguinte coletânea de estudos há uma maior compreensão dos métodos que vêm sendo utilizados em diferentes laboratórios pelo mundo.

#### 4.4. Aplicações de nanopartículas de ouro, com enfoque em câncer

O câncer é apontado como um dos maiores causadores de mortes na humanidade. Sendo assim, os cientistas estão cada vez mais focados em encontrar soluções para melhorar a qualidade de vida das pessoas que sofrem dessa doença. Diferentes formas de redução dos efeitos colaterais dos fármacos usados para eliminar células cancerosas vêm sendo investigadas. Esses efeitos colaterais são originados pela falta de especificidade do quimioterápico, que além de atacar células cancerosas, ataca as células normais do paciente também. A fim de encontrar o tratamento ideal que atinja somente células cancerosas, pesquisadores vêm buscando a "bala mágica" (do inglês *magic bullet*). Além da utilização para o tratamento, essa precisão poderia ajudar também no diagnóstico da doença. (BAZAK *et al.*, 2014).

Atualmente, muitos tratamentos utilizados para combater o câncer não têm a eficácia esperada, pois são rapidamente eliminados do citoplasma e metabolizados, sendo transformados em formas inativas. Dessa maneira as formas inativas acabam por impedir o andamento eficiente do tratamento. (KANNAN *et al.*, 2012). Por esse motivo, novas estratégias foram criadas para minimizar essa problemática. Nanopartículas podem apresentar a importante característica de especificidade e, portanto, diferentes métodos de tratamento via nanopartículas estão sendo descritos.

Inicialmente, AuNPs foram testadas para investigar o nível de toxicidade nos tecidos, porém, de acordo com Hainfeld (2004) nenhum dano bioquímico ou hematológico foi observado, baseado na aplicação de AuNPs de 1,9 nm (2,7g Au/kg) por meio de injeção intravenosa. Outro cientista também fez experimentos com o

objetivo de investigar o nível de toxicidade para AuNPs de 13,5 nm administradas em três diferentes rotas: oral, injeção na veia caudal e injeção intraperitoneal. Os resultados mostraram índices baixos de toxicidade para baixas concentrações de AuNPs utilizadas, porém, conforme a concentração de nanopartículas foi aumentando, observou-se a redução de peso em alguns animais e dano significativo aos órgãos. As rotas de administração que mais causaram toxicidade foram a oral e intraperitoneal. (ZHANG *et al.*, 2010). E, de acordo com Cabral (2014) apesar dos esforços para utilizar AuNPs em estágios clínicos, poucas triagens clínicas foram realizadas pois a toxicidade dependente de tamanho, superfície de contato e forma. Portanto, esses aspectos precisam ser mais estudados, assim como a limitação em capacidade de penetração de tecido e a propriedade não biodegradável que pode resultar em acumulação, dificultando a eliminação das AuNPs nas excretas.

Diversos experimentos estão sendo executados para confirmar a eficácia e possíveis utilizações dessas. Foram descritas possibilidades de administração de nanopartículas juntamente com ácidos nucleicos, quimioterápicos e radiosensores atuando de modo via alvo ativo ou alvo passivo. A ligação de nanopartículas diretamente em células doentes através de interação entre ligantes adsorvidos às nanopartículas com receptores das células é denominada alvo ativo. Já a simples localização de nanopartículas em tecidos de permeação e retenção aumentadas, como vasculaturas tumorais (efeito EPR - permeabilidade aumentada e retenção) é denominada de alvo passivo. (CAPCO; CHEN, 2014). Há uma supressão de filtração linfática nessa vasculatura, possibilitando uma retenção maior de macromoléculas e partículas no espaço intersticial do tumor. As principais características dos nanocompósitos carreadores de fármacos que devem ser levadas em consideração e que podem modular e/ou maximizar o efeito EPR são: tamanho, forma e carga das partículas. Um fato interessante sobre o efeito EPR, é que ele é raramente encontrado em cânceres de pâncreas e de estômago. (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2016).

O direcionamento de nanopartículas via alvo ativo compreende a ligação a receptores como  $\alpha_v\beta_3$ .integrinas, ácido fólico e antígeno específico de membrana da próstata (PSMA), por exemplo. Estudos também têm sido realizados em relação a

outros alvos, como aptâmeros, anticorpos, moléculas pequenas e peptídeos. Um grupo de estudo da *California Institute for Technology* mostrou que as nanopartículas dirigidas ativamente têm índices maiores de entrega de drogas a células cancerígenas do que nanopartículas direcionadas pelo método passivo. O método via alvo ativo também tem outros benefícios: redução do reconhecimento imunológico do fármaco carregado pela nanopartícula e uma liberação que possibilita circulação eficiente para atingir células cancerígenas. (ZAMBONI *et al.*, 2012).

Para que esse tratamento via nanopartículas pelo modo ativo seja realizado eficientemente e torne-se viável para indivíduos responsivos à terapia, é necessário que haja uma análise de fenótipos não reativos na população em geral, ou seja, alguns indivíduos que podem não responder a esse tratamento. Além de verificar se mutações ou mudanças de fenótipo ocorrem nas vias metabólicas ou nos receptores de superfície ao longo da terapia. Logo, avanços nas áreas de fenotipagem e genotipagem auxiliariam no desenvolvimento e aperfeiçoamento da nanobiotecnologia, inclusive no tratamento ao câncer. E para o tratamento que utiliza as nanopartículas por via alvo passivo algumas melhorias significativas poderiam ser realizadas nos quesitos de propriedades físico-químicas que influenciariam a deposição e difusão de nanomateriais no tumor. Além disso, o processo de selecionar pacientes que sejam suscetíveis ao efeito EPR do método via alvo passivo também é outra forma viável para realizar o tratamento. Para a via alvo passivo, tecnologias de triagem de biomarcadores e fenotipagem de pacientes seriam as ideais, além da importância do uso de equipamentos clínicos para imagem, para que se tenha uma abordagem menos invasiva. (BERTRAND *et al.*, 2014).

Pesquisas demonstraram que AuNPs que têm suas propriedades de superfície modificadas teriam a capacidade de controlar sua acumulação em tumores, influenciando também na liberação dos fármacos na área afetada por células tumorais. AuNPs que foram funcionalizadas com uma monocamada de PEG (Polietileno glicol) tiolado e um grupo de carboxilato demonstraram uma significativa melhoria em entrega de fármacos anticâncer de platina como oxaliplatina, carboplatina e cisplatina. (BROWN *et al.*, 2010). Ademais, AuNPs que foram conjugadas com albumina de soro

bovino obtiveram um resultado muito significativo e hoje são considerados como um dos melhores veículos para a entrega de fármacos, devido à baixa taxa de associação não-específica, tendo maior controle na biodistribuição em tecidos. (MARIAM *et al.*, 2015). A ligação entre albumina de soro bovino com conjugados de cloroquina com AuNPs funcionalizadas com tiol foi observada e mostrou-se útil em combinações com outras terapias para combate ao câncer. (JOSHI *et al.*, 2011).

Outra estratégia na administração de AuNPs para o tratamento de câncer se dá através do revestimento das nanopartículas com PEG-gPLL (metoxi-polietileno-glicol-enxerto de poli (L-lisina) copolímero). AuNPs revestidas com PEG-gPLL passam por um processo de estabilização para formar partículas fracamente positivas, passando a serem chamadas de AuNP<sub>3</sub>. Os resultados indicam que esse complexo foi altamente captado em células endoteliais humanas, com nível de toxicidade baixo. Porém, ocorreu alta toxicidade dependente da dose em células cancerosas epiteliais. Assim, o estudo evidenciou a capacidade de AuNPs revestidas com PEG-pPLL de se encontrarem *in vivo* como formas não agregativas e biocompatíveis para uso em terapias de câncer. (BOGDANOV *et al.*, 2015).

Além disso, uma alternativa para obter maior eficiência para o tratamento de câncer encontra-se no conceito de atingir organelas específicas da célula através do uso de AuNPs, aumentando assim o impacto em células tumorais. Seguindo essa lógica, as AuNPs estão sendo produzidas a fim de concentrarem-se em compartimentos subcelulares, gerando destruição das funções intrínsecas de células cancerosas, vitais para a sobrevivência do tumor. Essa destruição pode ser realizada através de diferentes vias: por meio de entrega de agentes anticâncer, dano mecânico localizado no compartimento subcelular e ablação fototérmica eficiente devido à alta concentração de AuNPs no local. Essa estratégia é também importante no aspecto de reduzir a toxicidade, por diminuir a quantidade necessária de carregamento de drogas e nanopartículas de ouro. Alguns exemplos de drogas que são carregadas pelas nanopartículas são: doxorrubicina, drogas baseadas em platina e paclitaxel, que afetam núcleo e mitocôndrias respectivamente. As AuNPs que atingem o núcleo podem danificar a célula tumoral, interferindo com os processos de crescimento celular,

proliferação e apoptose, chegando até a provocar modificações no tamanho do núcleo, forma do envelope e organização de cromatina. Um exemplo disso, são as nanoesferas ou nanoflores de AuNPs que danificam membranas celulares, lamínas nucleares e funções nucleolares, porém, não foi observada danos por partículas maiores em modelo de câncer de mama. Além do núcleo, as mitocôndrias também podem ser afetadas pelas nanopartículas com o objetivo de tratar o câncer, por serem responsáveis pela produção de energia na célula e regulação da morte celular. Algumas consequências de atingir a mitocôndria com as AuNPs incluem modificações morfológicas na organela, perda de potencial de membrana e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). (KODIHA *et al.*, 2015).

A terapia denominada fototérmica é outra das muitas aplicações das AuNPs. Essa terapia é responsável pela eliminação de tumores por meio de elevação da temperatura, para aproximadamente 45°C. Com isso, ocorre maior controle do tumor no local e aumento na eficácia fototérmica devido à redução de energia necessária para uso de lasers, reduzindo assim o risco de toxicidade para tecidos próximos. (CABRAL; BAPTISTA, 2014). De acordo com os fatos apresentados, essa terapia se mostra útil, mas tem seus efeitos colaterais, principalmente em relação às AuNPs que têm uma forte eficácia fototérmica, pois essas nanopartículas não são excretadas do organismo. Porém, mais experimentos precisam ser realizados para confirmar sua real eficiência em combater as células tumorais e no pós-tratamento com as partículas. (LIU *et al.*, 2013).

Outro estudo juntou duas terapias semelhantes, a fototérmica e a fotodinâmica. Sendo que, a terapia fotodinâmica refere-se a uma reação química que é ativada pela luz, utilizada para destruição seletiva de um tecido, requerendo, além da luz, o agente fotossensibilizante no tecido-alvo e oxigênio, gerando então as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS). (ALMEIDA ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). No estudo, a quantidade de 400 µg de nanocompósitos de ouro (nanobastões de ouro revestidos por sílica mesoporosa) foi injetada diretamente em tumores dos fígados de ratos, além disso, ondas contínuas com radiação próxima ao infravermelho foram utilizadas com o intuito de potencializar as características antitumorais fotodinâmicas e fototérmicas dos

nanocompósitos. Observou-se que após 72 horas o tumor já havia sido inteiramente eliminado. No entanto, as duas terapias realizadas separadamente não obtiveram o mesmo efeito do que quando foram combinadas. (KHLEBTSOV *et al.*, 2013).

Visto que a terapia fotodinâmica, quando utilizada sozinha, tem alcance de radiação infravermelha limitado, outra alternativa passível de ser utilizada seria a terapia sonodinâmica. Essa terapia usa ultrassom terapêutico, e por isso, penetra mais profundamente no tecido, sem perda significativa de energia. Além disso, o ultrassom penetra as camadas de tecido para atingir somente um ponto focal para excitar agentes sensibilizadores locais, com precisão, mostrando-se uma alternativa mais segura e pouco invasiva. Uma pesquisa feita com a aplicação da terapia sonodinâmica juntamente com nanocompósitos administrados via sistêmica (hidrofilizados de Au-TiO<sub>2</sub>) mostrou-se promissora, pois com a exposição dos nanocompósitos à terapia sonodinâmica houve a geração de ROS e posterior bloqueio no crescimento de tumores de cólon em camundongos. (DEEPAGAN *et al.*, 2016).

Outro sistema de administração de nanopartículas em estudo são as AuNPs radioativas e biocompatíveis com o objetivo de tratar o câncer de próstata e outros tipos de câncer inoperáveis. O alcance de AuNPs funcionalizadas com goma arábica e radioativas- $\beta$  de <sup>198</sup>Au é grande o suficiente para atravessar as glândulas da próstata e suficientemente curta para minimizar efeitos colaterais em tecidos próximos. O <sup>198</sup>Au foi escolhido por sua capacidade de gerar emissão de energia  $\beta$  e meia-vida suficientes para eliminação de tumores. Além disso, resultados farmacocinéticos dessa pesquisa confirmaram a excelente acumulação de cargas terapêuticas de Goma Arabica<sup>198</sup>Au em tumores na próstata com pouco vazamento para órgãos que não eram alvos da terapia. Devido a essa acumulação de GA-<sup>198</sup>AuNPS dentro de tumores na próstata, as partículas têm o potencial de destruir células tumorais em áreas localizadas e por isso, é possível impedir a disseminação celular e recrutar células tumorais para dentro da medula óssea, o que ajuda a diminuir o número de metástases da próstata. (KANNAN *et al.*, 2012).

Algumas questões sobre AuNPs precisam ser solucionadas em um futuro próximo, como: interações de nanopartículas com células específicas, compartimentalização celular, mecanismo de entrada e tráfego através do corpo. (BHATTACHARYYA *et al.*, 2011). Outra abordagem interessante para um futuro próximo seria a utilização de plataformas nanoteranósticas, onde médicos poderiam tomar decisões baseadas em informações obtidas de aplicativos, possibilitando assim tratamentos mais personalizados para cada paciente em tempo real. (CABRAL; BAPTISTA, 2014).

Atualmente, as AuNPs já vêm sendo comercializadas, principalmente as nanoesferas e nanobastões de ouro, com o intuito de serem utilizadas em contrastes para diagnósticos e tratamentos com terapia hipertérmica. (ESTADOS UNIDOS/CANADÁ. Nanopartz, 2016).

## PARTE II

Existem duas formas principais de síntese de nanopartículas. A primeira refere-se à formação das nanopartículas a partir do processo de *bottom up*, onde reações químicas, como precipitação de óxidos ou redução de íons metálicos, são as responsáveis pelo crescimento e formação de diferentes tipos de nanopartículas. Os pontos positivos da técnica seriam: bom rendimento, fácil aplicabilidade e baixo custo energético. Porém, um ponto negativo seria uma maior formação de diferentes tamanhos de nanopartículas, em relação ao método *top down*. A segunda forma, denominada de *top down*, seria a transformação de um material macroscópico em um nanomaterial, por meio de processos físicos, para então resultar em uma nanopartícula com formato definido. Assim, algumas das vantagens do método seriam a formação de nanopartículas com tamanho e formato bem definidos e mais estáveis do que com o método *bottom up*. Além disso, por não haver um revestimento como há no método *bottom up* a manipulação de superfície se torna mais acessível. Logo, as desvantagens seriam o baixo rendimento, alto custo energético e a difícil adaptação à produção em larga escala. (PEREIRA, 2014).

Essa segunda parte do trabalho consiste no início de um projeto maior, que visa rastrear possíveis efeitos derivados do tratamento *in vitro* com GA-AuNPs de diferentes formatos (esféricas ou bastões) sobre o funcionamento de diferentes tipos celulares (células de melanoma, fibroblastos e macrófagos) em diferentes concentrações e tempos de tratamento (24 – 96 horas). Para que se possa utilizar AuNPs para o estudo em modelos celulares *in vitro*, muitas etapas são necessárias. A primeira etapa é a síntese e caracterização dessas AuNPs. A segunda, é a estabilização das nanopartículas em meio de cultura celular, verificando a manutenção das características originais das partículas, bem como a ausência de agregados. A terceira etapa, por fim, concentra-se na aplicação sobre as células.

## 5 OBJETIVOS

Sintetizar quimicamente nanoesferas e nanobastões de ouro revestidas com goma arábica e verificar sua estabilidade em condições artificiais de cultura (*in vitro*).

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Síntese de nanoesferas de ouro funcionalizadas com goma arábica (GA-AuNPs)

Para realizar a síntese de GA-AuNPs, os seguintes materiais foram utilizados: ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 30% em HCl diluído, 99,9%) (Sigma-Aldrich), boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ,  $\geq 98\%$ ) (Nuclear), goma arábica (GA) dialisada ( $M_w = 9.3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , 17% conteúdo de ácido urânico) (Sigma-Aldrich). Água de grau Milli-Q foi usada para o preparo de todas as soluções (18.2 M $\Omega$ cm, Millipore). Para dialisar a GA foi necessário solubilizar o pó de goma arábica em água, deixou-se *overnight* a 4°C, e então, a solução foi dialisada por 48h em água destilada através de uma membrana de diálise (limite de 12-14 kDa) com posterior liofilização. Os reagentes e a goma já dialisada foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de macromoléculas e interfaces, Departamento de Química da UFPR, seguindo protocolo específico. (BARROS, DE et al., 2016).

A síntese de GA-AuNPs foi realizada através da preparação da solução que necessita de 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$  ( $1,75 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ ) e 5 mL de GA (0,1% em  $\text{H}_2\text{O}$ ). A adição dos reagentes foi realizada a 25°C, sob agitação branda por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado  $\text{NaBH}_4$  (2,4 mL de solução 1mM preparada na hora e deixada no freezer por no máximo 40 minutos) sob agitação por 30 minutos.

## 6.2. Esterilização das GA-AuNPs e teste de estabilidade em meio de cultura

A filtração das GA-AuNPs foi a forma de esterilização encontrada para que o material pudesse ser utilizado em meio de cultura celular. Para a filtração, foram utilizadas ponteiras esterilizadas no microondas por 15 minutos, e a filtração das GA-AuNPs foi realizada em membrana de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Com essa membrana de filtração fina foi possível haver uma esterilização da solução por meio da retenção de partículas acima de 0,22  $\mu\text{m}$ , possibilitando assim a eliminação de, por exemplo, poeira e microrganismos da solução com as GA-AuNPs.

Para o teste de estabilidade, a solução final foi obtida através da adição de 3 mL de GA-AuNPs + 3 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO) contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 0,11 g/L de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB) (LifeTechnologies) não inativado, 1 U/mL de penicilina e 1  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina (LifeTechnologies). Essa solução foi então dividida em dois tubos de centrifuga de 15 mL. Um deles foi analisado no equipamento UV-vis de espectroscopia (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) para observar a banda plasmônica e o outro foi deixado na incubadora (Thermo Scientific, modelo series 8000 WJ) a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , durante 7 dias. Após esses 7 dias, o tubo com a solução de GA-AuNPs foi analisado no espectrofotômetro, para ser possível uma comparação entre o dia 0 e dia 7. O programa utilizado para plotar o gráfico obtido pelo equipamento de espectrofotometria foi o OriginPro 8.5, sendo possível a visualização das devidas bandas plasmônicas.

## 6.3. Lavagem das GA-AuNPs

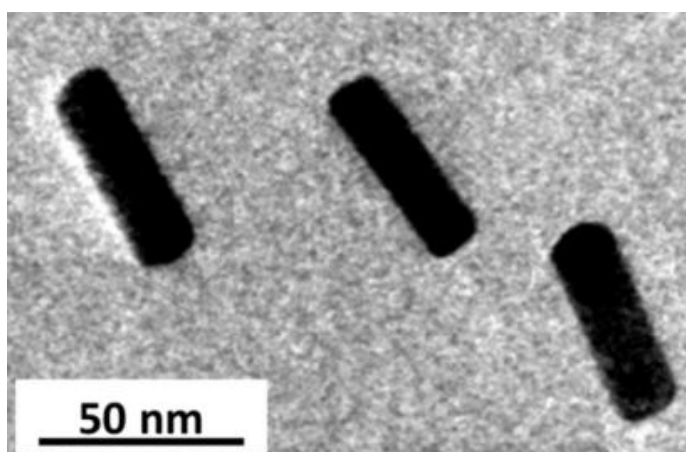
Essa segunda filtração das GA-AuNPs foi realizada para retirar o excesso de  $\text{NaBH}_4$  que poderia ser nocivo quando a solução de GA-AuNPs foi utilizada no meio de cultura celular. Assim, foi utilizado um tubo de centrifuga (Millipore, modelo Amicon Ultra-15) com membrana com poros que retinham moléculas maiores que 10kDa.

Inicialmente, havia 9 mL de solução com GA-AuNPs que foi colocado no tubo e centrifugado a 5.000 rcf por 10 minutos. Depois da centrifugação foi adicionado 10 mL de água milliQ no tubo e centrifugou-se novamente. Esse procedimento de centrifugação com adição de água MilliQ (10 - 12 mL) e reserva do conteúdo filtrado foi realizado pelo menos mais 4 vezes. O volume obtido ao final das centrifugações foi completado novamente para 9 mL com água Mili-Q.

#### 6.4. Síntese de nanobastões de ouro funcionalizados com goma arábica (GA-AuNRs)

A síntese de AuNRs, feita de acordo com o método descrito por (BARROS, DE *et al.*, 2016), utilizou, primeiramente, o processo de “Seed” que tem como objetivo a formação de AuNPs. Posteriormente, um crescimento unidirecional e longitudinal foi gerado através do processo “Growth”, o qual é caracterizado pela adição de CTAB, responsável pela interação entre os grupos polares do composto. O formato das AuNRs pode ser observado na FIGURA 4 a seguir:

FIGURA 4 – NANOASTÕES DE OURO



Microscopia (MET) ilustrando o formato dos nanobastões de ouro.

FONTE: H.R. de Barros et al. / Carbohydrate Polymers 152 (2016) 479–486

Para a síntese de AuNRs, os materiais usados foram: ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 30% em HCl diluído, 99,9%) (Sigma-Aldrich), CTAB ( $\geq 98\%$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ,  $\geq 98\%$ ) (Nuclear), goma arábica dialisada ( $M_w = 9.3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , 17% conteúdo de ácido urânico) (Sigma-Aldrich), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $> 99\%$ ) (Sigma-Aldrich) e ácido ascórbico (AA,  $> 99\%$ ) (Dinâmica). O protocolo seguido foi o descrito anteriormente. (BARROS, DE *et al.*, 2016).

A síntese de AuNRs foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na preparação de uma solução denominada “seed” onde adicionou-se 2,5 mL de CTAB (0,2 mol/L), 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$  ( $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ), sendo submetida a agitação com o auxílio de barra magnética. Após a mistura, adicionou-se mais 0,6 mL de  $\text{NaBH}_4$  (0,01 mol/L) sob agitação por 2 minutos. Em seguida, foi preparada a solução denominada “growth”, com a adição de 2,5 mL de CTAB (0,2 mol/L), 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$  ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ), 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  ( $4 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ), também sob agitação com auxílio de barra magnética. Depois disso, mais 70  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico ( $80 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) e 12  $\mu\text{L}$  da solução “seed” foram adicionados e ficaram 10 segundos sob agitação com barra magnética.

A suspensão de AuNRs obtida foi centrifugada, o sobrenadante descartado, e então os AuNRs foram ressuspendidos em solução de GA 0,04% para a funcionalização.

### 6.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET foi a principal técnica utilizada nesse trabalho, com a finalidade de analisar o formato e tamanho das GA-AuNPs. Essa análise foi realizada após preparação de grades de cobre, revestidas com carbono, com uma gota de solução coloidal ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ). A amostra foi então deixada para secar sob pressão reduzida de

dessecador. O microscópio utilizado foi o JEOL 1200-EX-II, funcionando a 80 kV, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFPR). (BARROS, DE, 2014)

A análise foi realizada no programa FIJI – ImageJ com o objetivo de quantificar as GA-AuNPs das fotomicrografias obtidas pela MET (5 imagens de áreas aleatórias da amostra). Então, o programa GraphPad Prism 6 possibilitou a construção de gráfico que mostra a dispersão de tamanho das GA-AuNPs obtidas.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Nanoesferas de Ouro (GA-AuNPs) - Síntese e caracterização das GA-AuNPs**

Ao final da síntese de nanoesferas foi possível observar, através da mudança de cor, a reação dando origem as GA-AuNPs. A cor da solução tornou-se avermelhada, como podemos observar na FIGURA 5. Essa coloração característica para cada formato e tamanho de nanopartículas derivadas de metais nobres se deve às diferentes interações de cada partícula com a luz incidida sobre a amostra. Ondas eletromagnéticas de diferentes comprimentos de onda (diferentes cores de luz) interferem na polarização dos elétrons livres presentes na superfície das nanopartículas, gerando ressonâncias plasmônicas de superfície (banda plasmônica). A ressonância plasmônica é, portanto, capaz de absorver e/ou espalhar determinados comprimentos de onda. (EUSTIS; EL-SAYED, 2006). Além disso, a ressonância plasmônica é específica de nanopartículas metálicas e está relacionada com a oscilação coletiva de elétrons na superfície metálica, dando assim, mais informações sobre o tamanho das nanopartículas. (BRUN; ROSELLI, 2014).

FIGURA 5 – SÍNTESE DE GA-AuNPs

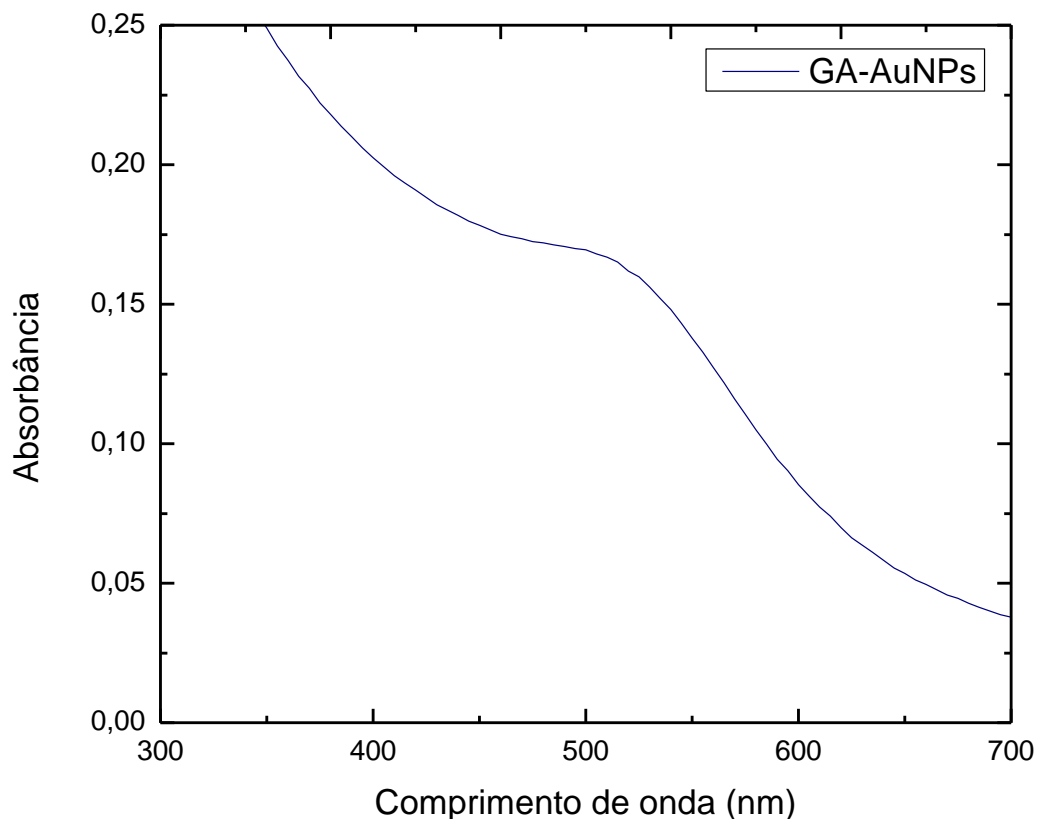


Reator com a solução de GA-AuNPs recém-sintetizada. A cor avermelhada da solução dá indícios de que a síntese foi realizada adequadamente.

FONTE: O autor (2016)

Dessa forma, a caracterização das GA-AuNPs foi feita através de duas metodologias: análise do espectro de absorção UV-Visível da banda plasmônica e MET. Portanto, a amostra foi submetida a uma varredura UV-vis em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) e o resultado obtido pode ser observado no GRÁFICO 1, que mostra o pico de absorbância da banda plasmônica das GA-AuNPs, no comprimento de onda ~ 520 nm.

\*GRÁFICO 1 – ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA UV-VIS DA BANDA PLASMÔNICA DAS GA-AuNPs



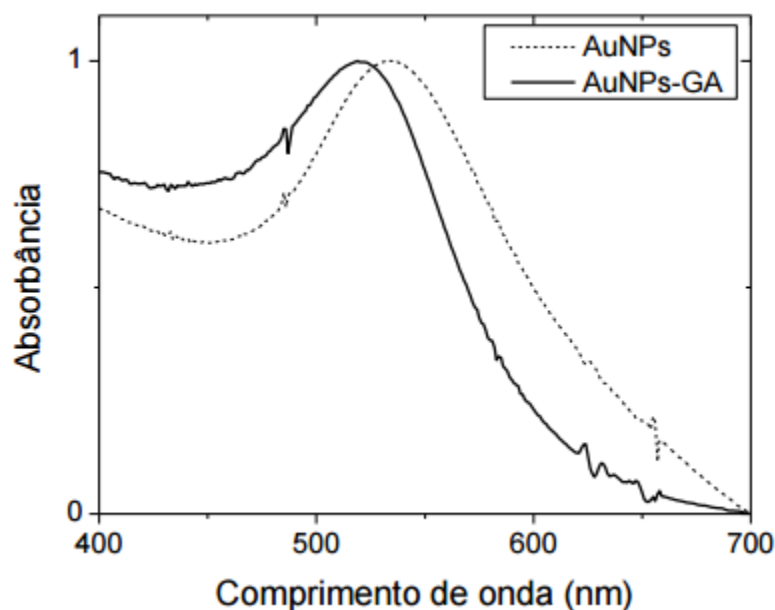
O gráfico acima ilustra a banda plasmônica de GA-AuNPs (~520 nm).

FONTE: O autor (2016)

\*Observar que os eixos do gráfico precisam ser reajustados para melhor visualização.

A fim de comparação, o GRÁFICO 2 (BARROS, DE *et al.*, 2016) mostra picos bem definidos, no comprimento de onda ~ 520 nm para GA-AuNPs e ~ 550 nm para AuNPs sem GA. Indicando assim um padrão de bandas plasmônicas dependente da composição das AuNPs.

GRÁFICO 2 – BANDAS PLASMÔNICAS DE AUNPS



Representação das bandas plasmônicas de AuNPs, com diferentes revestimentos.

FONTE: H.R. de Barros et al. / Carbohydrate Polymers 152 (2016) 479–486.

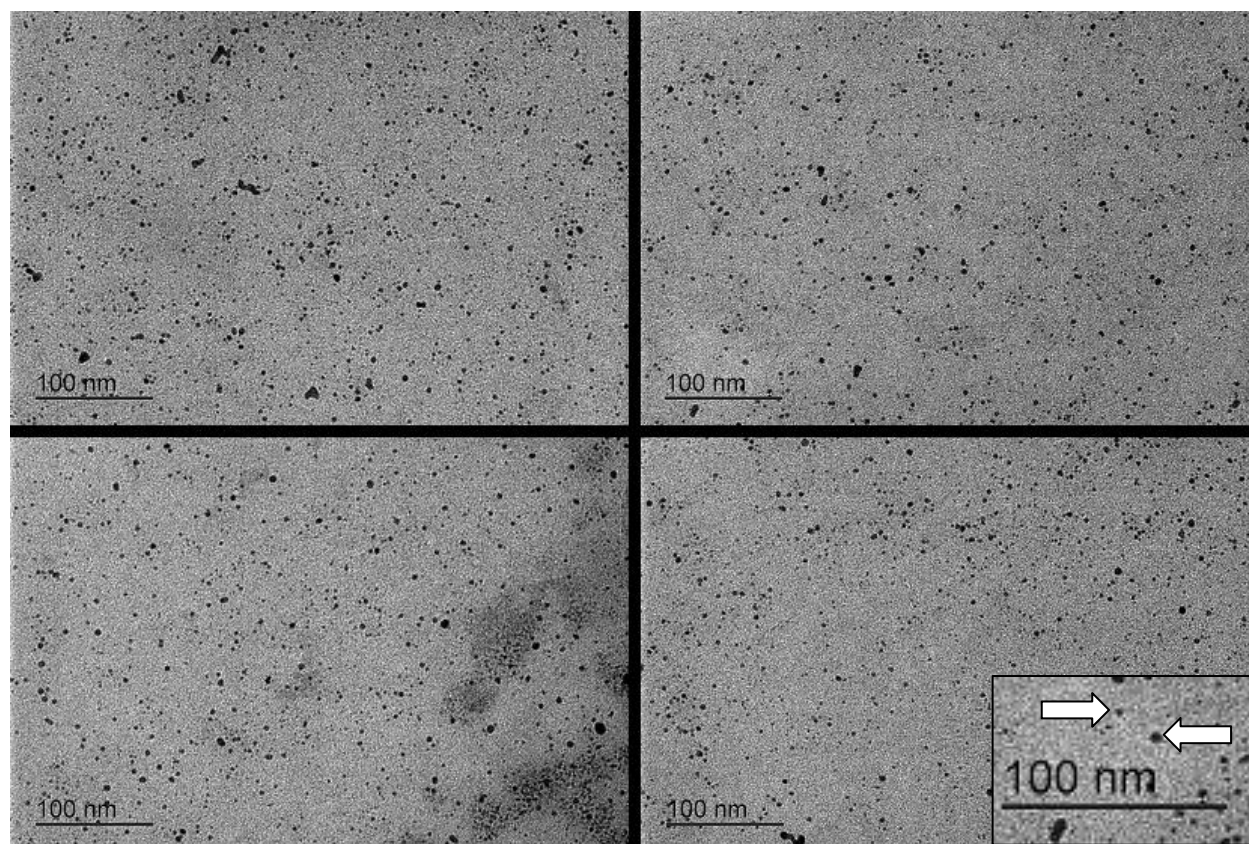
Comparando o gráfico desse estudo com o gráfico acima (BARROS, DE *et al.*, 2016), é possível observar que o segundo apresenta bandas plasmônicas mais definidas. Um fator a ser considerado com relação a essa diferença observada seria a temperatura que foi utilizada nos diferentes experimentos. Barros e colaboradores (2016) utilizaram temperatura de 25°C e as sínteses desse trabalho foram realizadas a temperatura ambiente. Por isso, nas próximas repetições dessa síntese, será levada em consideração a utilização de temperatura fixa.

Essa análise de banda plasmônica só é possível de ser realizada pois as nanopartículas metálicas têm relevante propriedade óptica, além disso, ocorre interação entre radiação eletromagnética e características eletrônicas das AuNPs. Experimentos mostraram que o formato do espectro de absorvância está diretamente ligado ao tamanho das nanopartículas. (PEREIRA, 2009). Além disso, quanto menor a

nanopartícula for, menor será a banda plasmônica gerada por ela, pois a mesma apresenta menor densidade eletrônica comparado a uma nanopartícula de tamanho maior. (BARROS, DE *et al.*, 2016). Nesse caso, as nanoesferas, que também têm seu formato e tamanho definido pelo método de síntese utilizado, deveriam apresentar um tamanho  $\leq 5$  nm, com base no artigo. (BARROS, DE, 2014).

Outro instrumento especializado que também foi utilizado para analisar as GA-AuNPs em meio completo foi o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Uma prancha com 4 das 5 imagens obtidas através de MET pode ser observada na FIGURA 6 abaixo.

FIGURA 6 – MET DAS GA-AuNPs

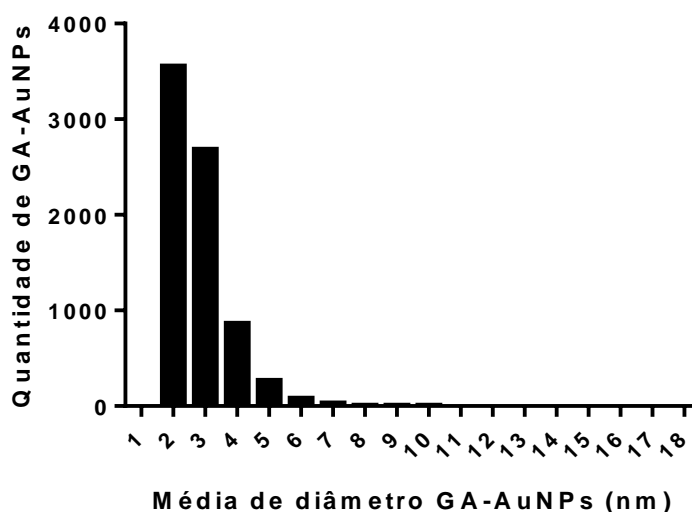


As imagens obtidas através de MET representam o tamanho médio das GA-AuNPs observadas. Inseto representa uma ampliação de parte da imagem, onde nanoesferas são apontadas (setas).

FONTE: O autor (2016)

Pela MET foi possível identificar as nanoesferas (~ 2-3 nm). No GRÁFICO 3 podemos observar a confirmação da média de diâmetro das GA-AuNPs, obtida através da análise feita com FIJI– ImageJ, que tinha como objetivo a quantificação da média de diâmetro das GA-AuNPs das fotomicrografias obtidas pelo MET (5 imagens de áreas aleatórias da amostra). Essa quantificação foi feita da seguinte forma: os valores obtidos pela análise do FIJI – ImageJ (onde o background do fundo foi subtraído para que não interferisse na contagem de nanopartículas), foram plotados em um arquivo do excel. Então, primeiramente, os valores foram divididos (um a um) por 1000 para transformá-los em números com decimais (formato brasileiro), depois, os mesmos valores foram divididos pelo valor de  $\pi$  ( $\pi = 3,1415$ ) e então fez-se a raiz quadrada dos mesmos para obter os respectivos raios. O diâmetro foi obtido através da multiplicação por 2 dos valores dos raios.

GRÁFICO 3 – MÉDIA DE DIÂMETRO DAS GA-AuNPs



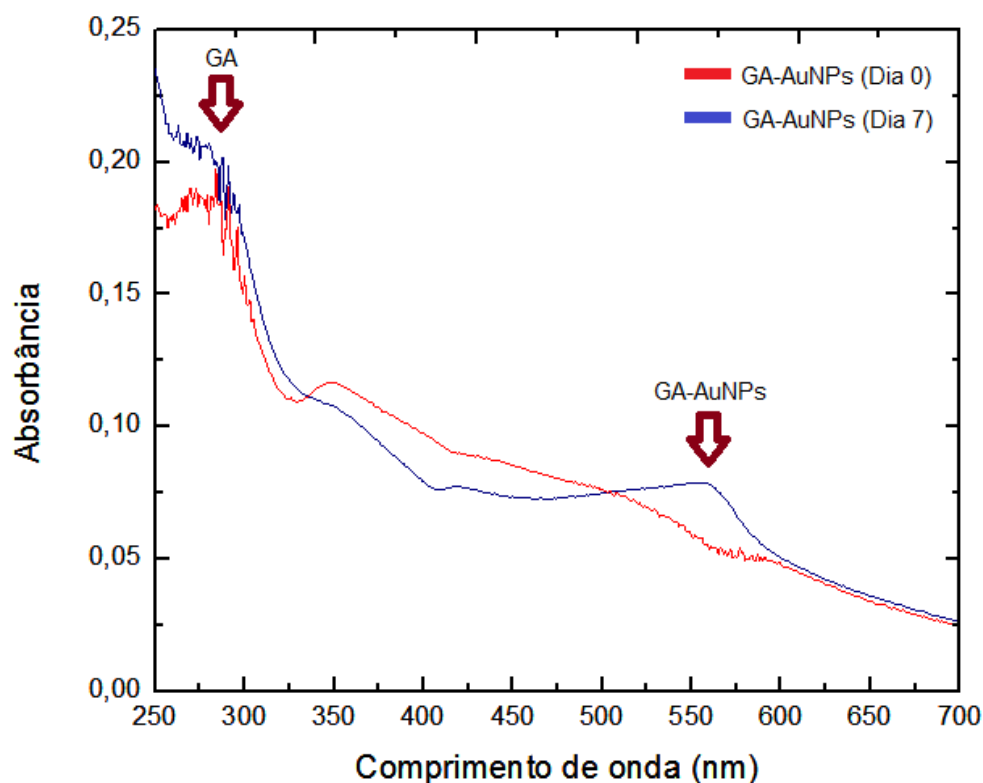
Média de diâmetro das GA-AuNPs pode ser observada no gráfico acima, indicando que o diâmetro médio estaria entre 2-3 nm. Os dados foram obtidos a partir da análise de imagens de MET, processadas no programa FIJI-Image e analisadas através do programa GraphPad Prism 6.

FONTE: O autor (2016)

### Teste de estabilidade das GA-AuNPs em meio/condições de cultura

Além disso, outra análise foi feita no equipamento UV-vis de espectroscopia, para observar o meio completo com as GA-AuNPs, para então fazer uma comparação desse meio com nanoesferas no dia 0 e, posteriormente, sete dias após a incubação em meio/condições de cultura celular (dia 7). O GRÁFICO 4 foi montado no Origin Pro 8.5, para fins de comparação entre os dias 0 e 7.

\*GRÁFICO 4 – MEIO COMPLETO + GA-AUNPS, DIA 0 e DIA 7 (MEIO COMO BASELINE)



As bandas plasmônicas de GA-AuNPs estão sendo comparadas, nos dias 0 e 7, em meio completo DMEM. A análise foi realizada no programa Origin Pro 8.5, utilizando o meio como baseline.

FONTE: Autor (2016)

\*Observar que os eixos do gráfico precisam ser reajustados para melhor visualização.

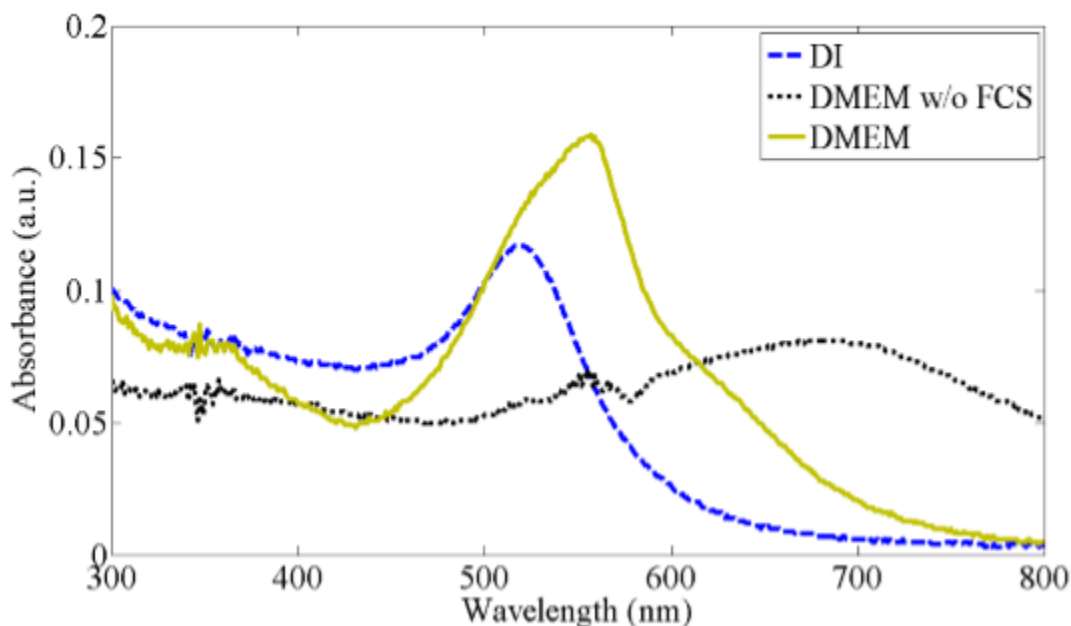
O outro tubo de centrifuga contendo as GA-AuNPs de ouro e o meio de cultura DMEM que foi deixado, na incubadora por 7 dias, sob temperatura de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, foi retirado e observou-se alteração da cor do meio para amarelado, devido a mudança de pH. O tubo de centrifuga ficou semiaberto na incubadora para que houvesse a circulação de CO<sub>2</sub>, e assim, o bicarbonato presente no meio atuou como tampão mantendo o pH 7, com o objetivo de simular as condições de cultivo celular e com isso houve a alteração da cor do meio por causa do pH. No GRÁFICO 4 observou-se uma possível interferência do vermelho de fenol do meio na leitura do dia 0, que tem um pico no mesmo comprimento de onda das GA-AuNPs, ~ 520 nm, pois o pico que aparecia anteriormente em GA-AuNPs em água (GRÁFICO 1) aparece de forma menos acentuada na leitura do dia 0. De acordo com CHO e colaboradores (2012), o vermelho de fenol causa essa interferência, pois o seu corante tem forte absorção no comprimento de onda 550 nm, sobrepondo-se ao pico de GA-AuNP.

Porém, podemos observar que no dia 7 essa interferência não está mais presente e um pico pôde ser visualizado, devido à mudança de coloração do meio devido a mudança de pH. Futuramente, um meio sem/ ou com pouco vermelho de fenol, deverá ser utilizado para otimização de resultados.

Como pudemos observar anteriormente, o meio de cultura celular tem um importante papel no que diz respeito a estabilização das GA-AuNPs. Em um estudo com nanopartículas de ouro em diferentes meios, em dois tipos celulares (células-T de leucemia humana Jurkat e carcinoma pancreático humano PANC1), observou-se que em meio de cultura celular suplementado com soro fetal de vitelo (SFV) houve menos agregação de nanopartículas de ouro do que em meio sem SFV. Isso se deve ao fato de que o soro rico em proteína SFV aumenta a dispersão das nanopartículas. (SABUNCU *et al.*, 2012). Essa diferença de agregação pode ser visualizada com espectroscopia, no GRÁFICO 5. Nela, é possível observar que o pico mais definido, em linha contínua, em ~ 550 nm é aquele em que as nanopartículas de ouro foram dispersas em DMEM com SFV. Na linha pontilhada, o pico não é definido, indicando

possível agregação das nanopartículas e o meio utilizado é o DMEM sem SFV. Já a linha tracejada ilustra a suspensão de nanopartículas de ouro em água deionizada.

GRÁFICO 5 – COMPARAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIOS



Diferentes espectros de bandas plasmônicas, com o intuito de comparar diferentes tipos de meio e como eles afetam na estabilidade de nanopartículas. DI = água deionizada; DMEM = meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* suplementado com soro fetal de vitelo; DMEM w/o FCS = meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* sem soro fetal de vitelo.

FONTE: SABUNCU *ET AL.* / ODU DIGITAL COMMONS 95 (2012) 96-102.

Um estudo sobre estabilização de AuNPs, realizado com AuNPs de tamanhos variados (7 a 60 nm), com revestimentos de citrato, BSA (Albumina Sérica Bovina), PVP (Polivinilpirrolidona) e PEG (Polietileno glicol) utilizou meios de cultura com diferentes forças iônicas sendo eles: água de mar artificial com diferentes salinidades, RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, contendo 10% de SFB), DMEM e DMEM com 10% de SFB, salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4 e tampão de fosfato de potássio (KPB) 0,1 M, pH 6,5 e 7,4. Os resultados mostraram que a

estabilidade das AuNPs pode ser classificada na seguinte ordem: BSA-AuNPs > PEG-AuNP > PVP-AuNPs > citrato-AuNPs. Em relação aos meios, a estabilização pode ser ranqueada da seguinte maneira: água de mar artificial > PBS > KPB > RPMI > DMEM. (BARRETO *et al.*, 2015).

A presença de uma corona biomolecular em nanopartículas também foi observada, onde a mesma seria formada por proteínas que se aderem à superfície quando expostas a um meio de cultura celular. Com isso, há um aumento no tamanho total das nanopartículas e possivelmente uma alteração de carga (positiva ou negativa). De acordo com Brun e Roselli (2014) quanto menor as AuNPs, maior será o aumento em diâmetro da corona biomolecular. Além disso, o tipo de meio também influencia no comportamento de absorção de proteínas e tamanho final da corona da nanopartícula. A presença da corona reduz captação celular não-específica, toxicidade da nanopartícula, influencia na biodistribuição e impacta na capacidade de atingir certos órgãos ou tecidos.

Para definir melhor quanto foi acrescido de corona biomolecular à nanopartícula, o método de dispersão dinâmica da luz é o mais utilizado e adequado. Com ele é possível obter o diâmetro hidrodinâmico (nanopartículas + proteínas aderidas à sua superfície), estabelecido em meio de cultura celular. Outro estudo mostra que nanopartículas de ouro são estáveis em meio RPMI na presença das proteínas SFV e SFB. Logo, as nanopartículas podem ser caracterizadas como dispersas, não agregadas, com revestimento de proteínas na superfície e toxicidade dependente de tamanho, em meio de cultura celular. (MAHL *et al.*, 2010).

A agregação das nanopartículas deve-se as forças de atração de Van der Waals que tem como objetivo a diminuição da reatividade e alta energia de superfície. Já o processo de Gibbs-Thomson tem o efeito contrário, em que nanopartículas são dissolvidas e a energia de superfície aumenta. Em uma solução, a estabilização das nanopartículas está ligada a forças de repulsão, além de propriedades intrínsecas das nanopartículas como carga de superfície e revestimento, assim como os íons e pH do meio utilizado. Assim, agregação e estabilização das nanopartículas estão interligadas,

pois a agregação pode modificar o tamanho das nanopartículas, a área de superfície e concentração. Por isso, os fatores mencionados, juntamente com as propriedades características das nanopartículas como solubilidade, forma, tamanho, área de superfície e composição química, devem ser levados em consideração no que diz respeito a estabilização em meio de cultura celular e posterior uso dessas nanopartículas em meio com células, podendo afetar a captação celular dessas nanopartículas e sua toxicidade relativa. (NGOC, 2014).

Um exemplo de estudo sobre agregação de AuNPs revestidas e não revestidas com PEG no trato gastrointestinal e sobre captação em órgãos e tecidos, mostra a importância do revestimento das nanopartículas. A escolha pelo uso de AuNPs vem da facilidade em serem visualizadas em MET e resistentes a diferentes variações de pH. Enquanto as AuNPs não revestidas com PEG aglomeraram-se nos primeiros 5 minutos em fluido gastrointestinal, as AuNPs revestidas com PEG não mostraram nenhuma aglomeração significativa mesmo após 24 horas. Em relação a captação das AuNPs revestidas e não revestidas em órgãos e tecidos, as AuNPs revestidas tiveram maior retenção do que AuNPs não revestidas em vários tecidos, após 24 horas, como no sangue, baço, cérebro, pulmões, rim e coração. Inclusive, foi observado que mesmo após 30 dias da administração oral das AuNPs, ainda havia uma significativa concentração de ouro em todos os tecidos do trato gastrointestinal. Porém, os resultados mostraram que houve menos de 1% de absorção da dosagem total, administrada por via oral. (HINKLEY *et al.*, 2015).

Como a goma arábica foi utilizada para revestir as AuNPs desse estudo, o problema com agregação foi possivelmente minimizado. A goma arábica (GA) é uma substância obtida através do exsudado de espécies de acácias, quando as mesmas são submetidas a algum tipo de estresse, como ataques microbianos e lesões físicas. A GA foi o estabilizante escolhido devido à baixa toxicidade, propriedades biocompatíveis, variedade de grupos funcionais ao longo de sua cadeia e complexidade estrutural. Esses grupos funcionais presentes na molécula de GA ligam-se às nanopartículas de ouro, revestindo a superfície do material e prevenindo assim a agregação das AuNPs. Existem duas formas de interações importantes que estão

envolvidas na estabilização das AuNPs. A primeira, é a força de repulsão eletrostática, responsável pela formação de uma dupla camada elétrica através de agregação de cargas (íons) pelas AuNPs e interação desses íons da superfície com íons próximos. A segunda força, é a de natureza estérica, onde há a adsorção de biomacromoléculas como a GA na superfície das AuNPs. Em um meio de cultura celular, algumas alterações podem influenciar no comportamento da força estérica, como modificações nas interações GA-AuNPs, GA-Meio de cultura e GA-GA, além de outras condições presentes no meio como solvente, pH e temperatura. Com o ajuste do pH do meio, é possível administrar melhor características como carga superficial das AuNPs e comportamento de forças iônicas envolvidas. (BARROS, DE, 2014).

Além disso, um ajuste no pH, em relação à cor do meio, auxiliaria a minimizar a interferência da cor do vermelho de fenol na banda plasmônica gerada pelas AuNPs. Como o estudo da estabilidade de GA-AuNPs foi realizado apenas uma vez, outras replicatas devem ser realizadas para comprovar a real estabilidade. E, caso a estabilidade das GA-AuNPs seja confirmada em meio de cultura celular, os próximos passos a serem realizados pelo grupo de pesquisa incluem os testes de viabilidade celular utilizando nanoesferas de ouro; avaliação da interação entre nanoesferas e outros tipos celulares; e comparação entre os efeitos gerados por nanoesferas e nanobastões.

### **Nanobastões de ouro (GA-AuNRs) - Síntese e caracterização das GA-AuNPs**

Para a formação dos nanobastões, a solução ficou em repouso por pelo menos 4 horas, após adição de todos os compostos químicos. Assim, foi possível observar a mudança de cor da solução, lentamente, de transparente para roxo, como pode ser observado na FIGURA 7.

FIGURA 7 - SÍNTESE DE NANOBASTÕES DE OURO



Reator com a solução de AuNRs, recém-sintetizada, antes da adição de GA.

FONTE: O autor (2016)

Porém, após análise com o equipamento de espectroscopia, foi possível observar que as bandas plasmônicas que deveriam aparecer nos comprimentos de onda  $\sim 750$  nm e  $\sim 520$  nm, não apareceram, indicando que não houve formação de nanobastões. Assim, não foi possível realizar as partes de esterilização, filtração e estabilização de GA-AuNRs em meio completo (DMEM). Uma possível razão para a não formação de AuNRs: temperatura ambiente diferente da utilizada no protocolo de (BARROS, 2014) que foi de  $25$  °C. Por isso, uma recomendação para as próximas repetições dessa síntese seria a verificação da temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento.

Visto que a síntese de AuNRs não foi possível de ser realizada, muito provavelmente pela temperatura local, uma parceria foi firmada com o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Mario Roberto Menguetti, da Universidade Federal de Alagoas, que irá fornecer essas AuNRs necessárias para futuras experimentações biológicas do Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas da Universidade Federal do Paraná. Além das experimentações biológicas, comparações entre as GA-AuNPs e GA-AuNRs serão realizadas, com o objetivo de verificar diferentes aplicações das mesmas em meio celular.

## 8 CONCLUSÃO

A primeira parte desta monografia reuniu diferentes estudos sobre câncer, melanoma, nanotecnologia, aplicações de nanopartículas de ouro, entre outros. Essa visão geral sobre os temas descritos possibilita a compreensão e conscientização da prevenção do câncer de pele, melanoma, por exemplo. Além disso, o melhor entendimento sobre assuntos como nanomateriais, nanocompósitos de metal e nanopartículas de ouro é muito importante para que haja uma comoção da comunidade científica brasileira, afim de estimular e produzir novos trabalhos na área. Logo, o objetivo de revisar as principais bibliografias atuais sobre AuNPs, suas aplicações e características, foi alcançado e o enfoque foi dado, principalmente, para novas alternativas de tratamentos de câncer utilizando as AuNPs.

Na segunda parte, o principal objetivo era a síntese e estabilização das nanoesferas e nanobastões de ouro em meio de cultura celular. A síntese de nanoesferas foi possível através do método de *bottom up*, sintetizando GA-AuNPs por meio de reações químicas. Já a síntese de nanobastões não foi possível. A parte experimental da estabilização de GA-AuNPs e GA-AuNRs em meio de cultura celular só foi possível de ser realizada para as GA-AuNPs, devido à tempo limitado e dificuldade na síntese de GA-AuNRs.

Logo, uma nova parceria com o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Mario Roberto Mengueti, da Universidade Federal de Alagoas, foi firmada. Onde, GA-AuNRs serão disponibilizadas para experimentação biológica, pelo Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas da Universidade Federal do Paraná.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA ISSA, M. C.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **An. Bras Dermatol.**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
- ANTONOVYCH, T. T. Gold nephropathy. **Ann Clin Lab Sci.**, v. 11, n. 5, p. 386–391, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7036839>>. Acesso em: 27/4/2016.
- ARVIZO, R.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. **Expert Opin Drug Deliv.**, v. 7, n. 6, p. 753–763, 2010.
- AUSTIN, L. A.; MACKEY, M. A.; DREADEN, E. C.; EL-SAYED, M. A. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. **Arch Toxicol.**, v. 88, n. 7, p. 1391–1417, 2014.
- BARRETO, Â.; LUIS, L. L.; GIRÃO, A. V.; TRINDADE, T. Behavior of colloidal gold nanoparticles in different ionic strength media. **J Nanopart Res**, v. 17, n. 493, p. 1–13, 2015.
- BARROS, H. R. DE. Aplicação de Goma Arábica na Estabilização e no Controle de Tamanho de Nanopartículas de Ouro em Meio Aquoso. , 2014.
- BARROS, H. R. DE; PIOVAN, L.; SASSAKI, G. L.; et al. Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 479–486, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716308074>>. .
- BASTIAN C, B. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annu Rev Pathol.**, v. 9, p. 239–271, 2014.
- BAZAK, R.; HOURI, M.; ACHY, S. EL; KAMEL, S.; REFAAT, T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, p.

769–784, 2014.

BERTRAND, N.; WU, J.; XIAOYANG, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 66, p. 2–25, 2014.

BHATTACHARYYA, S.; KUDGUS, R. A.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. **Pharm Res.**, v. 28, n. 2, p. 237–259, 2011.

BOGDANOV, A. A.; GUPTA, S.; KOSHKINA, N.; et al. Gold Nanoparticles Stabilized with MPEG-Grafted Poly(L-lysine): in Vitro and in Vivo Evaluation of a Potential Theranostic Agent. **Bioconjugate Chem.**, v. 26, n. 1, p. 39–50, 2015.

BROWN, S. D.; NATIVO, P.; SMITH, J.; et al. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, p. 4678–4684, 2010.

BRUN, E.; ROSELLI, C. S. Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction? **Cancer Nanotechnol**, v. 5, n. 7, p. 1–13, 2014.

CABRAL, R. M.; BAPTISTA, P. V. Anti-cancer precision theranostics: a focus on multifunctional gold nanoparticles. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 14, n. 8, p. 1041–52, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25314939>>. .

CAMARGO, P. H. C.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, F. Nanocomposites: synthesis, structure, properties and new application opportunities. **Mat. Res.**, v. 12, n. 1, p. 1–39, 2009. *Materials Research*. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-14392009000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392009000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es)>. Acesso em: 8/9/2015.

CAPCO, D. G.; CHEN, Y. **Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine**. Springer Science & Business Media, 2014.

CHANG, M. Y.; SHIAU, A. L.; CHEN, Y. H.; et al. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. **Cancer Sci**, v. 99, n. 7, p. 1479–1484, 2008.

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

CHO, E. C.; ZHANG, Q.; XIA, Y. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. **Nat Nanotechnol.**, v. 6, n. 6, p. 385–391, 2012.

CHOI, Y.-E.; KWAK, J.-W.; PARK, J. W. Nanotechnology for Early Cancer Detection. **Sensors**, v. 10, n. 1, p. 428–455, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/10/1/428/>>. .

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMIŃSKA, A. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.

CLARKE, H. J.; CHAMBERS, J. E.; LINIKER, E.; MARCINIAK, S. J. Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy. **Cancer Cell**, v. 25, p. 563–573, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.015>>. .

CONDE, J. The Golden Age in Cancer Nanobiotechnology: Quo Vadis? **Front Bioeng Biotechnol**, v. 3, n. 142, p. 1–4, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00142/abstract>>. .

COOPER, D. R.; BEKAH, D.; NADEAU, J. L. Gold nanoparticles and their alternatives for radiation therapy enhancement. **Front Chem**, v. 2, n. October, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fchem.2014.00086/full>>. .

COOPER, R. M. Behavior of Gold Nanoparticles in Physiological Environment and the Role of Agglomeration and Fractal Dimension . **Wright State University**, 2015.

DEEPAGAN, V. G.; YOU, D. G.; UM, W.; et al. Long-Circulating Au-TiO<sub>2</sub> Nanocomposite as a Sonosensitizer for ROS-Mediated Eradication of Cancer. **Nano Lett.**, v. 16, p. 6257–6264, 2016.

DELONG, R. K.; REYNOLDS, C. M.; MALCOLM, Y.; et al. Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and

other biological macromolecules. **Nanotechnol Sci Appl**, v. 3, n. 1, p. 53–63, 2010.

DIANZANI, C.; ZARA, G. P.; MAINA, G.; et al. Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, p. 1–12, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

DIOS, A. S. DE; DÍAZ-GARCÍA, M. E. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. **Anal. Chim. Acta**, v. 666, p. 1–22, 2010.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Multifunctional gold-based nanocomposites for theranostics. **Biomaterials**, v. 108, p. 13–34, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.040>>. .

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold : Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 209–217, 2006.

EVANS, M. S.; MADHUNAPANTULA V, S.; ROBERTSON P, G.; DRABICK J, J. Current and Future Trials of Targeted Therapies in Cutaneous Melanoma. **Adv Exp Med Biol.**, v. 779, p. 223–255, 2013.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold ( and Other Metals ) to Light. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 147, p. 145–181, 1857.

GHOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1307–1315, 2008.

GILSTRAP, K.; HU, X.; LU, X.; HE, X. Nanotechnology for energy-based cancer therapies. **Am. J. Cancer Res.**, v. 1, n. 4, p. 508–20, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3186049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GOWDA, R.; JONES, N. R.; BANERJEE, S.; ROBERTSON, G. P. Use of Nanotechnology to Develop Multi-Drug Inhibitors For Cancer Therapy. **J. Nanomed. Nanotech.**, v. 4, n. 6, p. 1–36, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4085796&tool=pmcentrez&r>

endertype=abstract>. .

GREISH, K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors : A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. **J. Drug Target.**, v. 15, n. 7-8, p. 457–464, 2007.

GUI, C.; CUI, D.-X. Functionalized gold nanorods for tumor imaging and targeted therapy. **Cancer Biol. Med.** v. 9, p. 221–33, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3643678&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>. .

HAINFELD, J. F.; SLATKIN, D. N.; SMILOWITZ, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy. **Phys. Med. Biol.**, v. 49, p. 309–315, 2004.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG A, R. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HINKLEY, G. K.; CARPINONE, P.; MUNSON, J. W.; POWERS, K. W.; ROBERTS, S. M. Oral absorption of PEG-coated versus uncoated gold nanospheres: does agglomeration matter ? **Part. Fibre Toxicol.**, v. 12, n. 9, p. 1–12, 2015.

HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; QIAN, W.; EL-SAYED, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, n. 6, p. 2115–2120, 2006.

HUTCHINGS, G. J.; BRUST, M.; SCHMIDBAUR, H. Gold — an introductory perspective. **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, p. 1759–1765, 2008.

JOSHI, P.; CHAKRABORTY, S.; DEY, S.; et al. Binding of chloroquine – conjugated gold nanoparticles with bovine serum albumin. **J. Colloid And Interface Sci.**, v. 355, p. 402–409, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.12.032>>. .

KANNAN, R.; ZAMBRE, A.; CHANDA, N.; et al. Functionalized radioactive gold nanoparticles in tumor therapy. **Wiley interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotech.**, v. 4, n. 1, p. 42–51, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953803>>. Acesso em: 3/2/2016.

KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **J. Phys. Chem. B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp026731y>>. .

KHAN, M. S.; VISHAKANTE, G. D. Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications. **Adv. Colloid and Interface Sci.**, v. 199-200, p. 44–58, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868613000699>>. Acesso em: 14/10/2015.

KHLEBTSOV, N.; BOGATYREV, V.; DYKMAN, L.; et al. Analytical and Theranostic Applications of Gold Nanoparticles and Multifunctional Nanocomposites: Erratum. **Theranostics**, v. 3, n. 12, p. 1012–1012, 2013. Ivyspring International Publisher. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881101/>>. Acesso em: 3/2/2016.

KODIHA, M.; WANG, Y. M.; HUTTER, E.; MAYSINGER, D.; STOCHAJ, U. Off to the organelles - killing cancer cells with targeted gold nanoparticles. **Theranostics**, v. 5, n. 4, p. 357–370, 2015.

LIM, E. K.; JANG, E.; LEE, K.; HAAM, S.; HUH, Y. M. Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology. **Pharmaceutics**, v. 5, p. 294–317, 2013.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–50, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314970>>. Acesso em: 3/2/2016.

LIU, C. P.; LIN, F. S.; CHIEN, C. TE; et al. In-situ formation and assembly of gold nanoparticles by gum Arabic as efficient photothermal agent for killing cancer cells. **Macromol. Biosci.**, v. 13, n. 10, p. 1314–1320, 2013.

MAHL, D.; GREULICH, C.; MEYER-ZAIKA, W.; MANFRED, K.; EPPLE, M. Gold nanoparticles: dispersibility in biological media and cell-biological effect. **J. Mater.**

**Chem.**, v. 20, p. 6176–6181, 2010.

MARIAM, J.; SIVAKAMI, S.; DONGRE, P. M. Albumin corona on nanoparticles – a strategic approach in drug delivery. **Drug Deliv.**, p. 1–9, 2015.

MEHTALA, J. G.; TORREGROSA-ALLEN, S.; ELZEY, B. D.; et al. Synergistic effects of cisplatin chemotherapy and gold nanorod-mediated hyperthermia on ovarian cancer cells and tumors. **Nanomed. (Lond)**, v. 9, n. 13, p. 1939–55, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4122688&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>. .

MUKHERJEE, P.; PATRA, C. R.; GHOSH, A. Characterization and Catalytic Activity of Gold Nanoparticles Synthesized by Autoreduction of Aqueous Chloroaurate Ions with Fumed Silica. **Chem. Mater.**, v. 14, p. 1678–1684, 2002.

NATIVO, P.; PRIOR, I. A.; BRUST, M. Uptake and Intracellular Fate of Surface-Modified Gold Nanoparticles. **Am. Chem. Soc.**, v. 2, n. 8, p. 1639–1644, 2008.

NGOC, T. T. T. The Life of Nanoparticles in Contact with Biological Media and Entities. **UAB**, 2014.

NORVELL, S. T.; BODURTHA, A. J. Cutaneous Malignant Melanoma. **CAN. FAM. PHYSICIAN**, v. 31, 1985.

PATRA, C. R.; BHATTACHARYA, R.; MUKHOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, P. Application of gold nanoparticles for targeted therapy in cancer. **J. Biomed Nanotechnol.**, v. 4, p. 99–132, 2008.

PATRA, C. R.; BHATTACHARYA, R.; WANG, E.; et al. Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. **Cancer Res.**, v. 68, p. 1970–1978, 2008.

PEREIRA, D. A. Síntese e funcionalização de nanopartículas de ouro para a formação de bionanoconjugados para o desenvolvimento de biossensores. **FCUP**, p. 10–97, 2014.

PEREIRA, M. K. Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento

Raman em Soluções Coloidais de Ouro. **UFRGS**, p. 1–92, 2009.

POSTOW, M. A.; CHESNEY, J.; PAVLICK, A. C.; et al. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, n. 21, p. 2006–2017, 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1414428>>\n<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891304>>. .

RIGON, R. B.; OYAFUSO, M. H.; FUJIMURA, A. T.; et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Antitumoral Therapy : A Review. **BioMed Res. Int.**, v. 2015, p. 1–20, 2015.

SABUNCU, A. C.; GRUBBS, J.; STACEY, M. W. Probing Nanoparticle Interactions in Cell Culture Media. **ODU Digital Commons**, v. 95, p. 96–102, 2012.

SALATA, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 3, 2004. BioMed Central. Disponível em: <<http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-2-3>>. Acesso em: 27/1/2015.

SCHADENDORF, D.; FISHER, D. E.; GARBE, C.; et al. Melanoma. **Nature Rev.**, v. 1, p. 1–20, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp20153>>. .

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399786>>. Acesso em: 9/7/2014.

SIMOES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Lett.**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.001>>. .

SINGH, S.; SHARMA, A.; ROBERTSON P, G. Realizing the Clinical Potential of Cancer Nanotechnology by Minimizing Toxicological and Targeted Delivery Concerns. **Cancer Res.**, v. 72, n. 22, p. 5663–5668, 2012.

TAURAN, Y.; BRIOUDE, A.; COLEMAN, A. W.; et al. Molecular recognition by gold,

silver and copper nanoparticles. **World J Biol Chem**, v. 4, n. 3, p. 35–63, 2013.

THAKOR, A S.; JOKERST, J.; ZAVALITA, C.; MASSOUD, T. F.; GAMBHIR, S. S. Gold nanoparticles: A revival in precious metal administration to patients. **Nano Lett.**, v. 11, p. 4029–4036, 2011.

TKACHENKO, A. G.; XIE, H.; COLEMAN, D.; et al. Multifunctional Gold Nanoparticle - Peptide Complexes for Nuclear Targeting. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 4700–4701, 2003.

TOY, R.; BAUER, L.; HOIMES, C.; GHAGHADA, K. B.; KARATHANASIS, E. Targeted nanotechnology for cancer imaging. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 76, n. 1, p. 79–97, 2014.

YANG, D.; CUI, D. Advances and Prospects of Gold Nanorods. **Chem. Asian J.**, v. 3, p. 2010–2022, 2008.

ZAMBONI, W. C.; TORCHILIN, V.; PATRI, A.; et al. Best Practices in Cancer Nanotechnology - Perspective from NCI Nanotechnology Alliance. **Clin Cancer Res.**, v. 18, n. 12, p. 3229–3241, 2012.

ZHANG, X.-D.; WU, H.; WU, D.; et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. **Int. J Nanomedicine**, v. 5, p. 771–781, 2010.

### **Sites:**

ESTADOS UNIDOS/ CANADÁ. Nanopartz. 2016. Disponível em: <https://www.nanopartz.com/>. Acesso em: 01/10/2016.

ESTADOS UNIDOS. National Institute of Environmental Health Sciences. 2016. Disponível em: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-nano/>. Acesso em: 03/07/2016.

World Health Organization. **Cancer**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 03/09/2016.