

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E EDUCAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)

INDIANI CONTI DELLA VECCHIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
EM CÉLULAS CANCERÍGENAS DE MELANOMA B16F10 E CÂNCER CERVICAL
HeLa**

CRICIÚMA, SC
2017

INDIANI CONTI DELLA VECCHIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
EM CÉLULAS CANCERÍGENAS DE MELANOMA B16F10 E CÂNCER CERVICAL
HeLa**

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

CRICIÚMA, SC

2017

INDIANI CONTI DELLA VECCHIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO
EM CÉLULAS CANCERÍGENAS DE MELANOMA B16F10 E CÂNCER CERVICAL
HeLa**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Biotecnologia.

Criciúma, 22 de Novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Ricardo Andrez Machado de Ávila – Doutor - UNESC - Orientador

Prof.º Eduardo Pacheco Rico – Doutor - UNESC

Prof.ª Daniela Pacheco Dos Santos Haupenthal – Mestre - UNESC

Dedico este trabalho à minha mãe, que tanto me apoiou e me incentivou a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, e principalmente à minha mãe. Por todo apoio, dedicação, compreensão, amparo e motivação em todos esses anos de graduação. Obrigada por me manter firme nos tempos difíceis e por muitas vezes abdicar de seus planos e sonhos para realizar os meus. Obrigada por acreditar que sou capaz e por fazer de tudo por mim! Nós duas sabemos que não foi nada fácil essa caminhada. Sem ela, jamais teria chegado até aqui.

À minha família e namorado, por torcerem e se preocuparem por mim, por todos os momentos de motivação, e alegrias que me deram, e pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Agradeço à minha irmã, que mesmo longe sempre me escutou e me aconselhou nos momentos de desespero e tristeza.

À melhor amiga que a biologia me deu, Taís Leffa². Obrigada, por todos estes anos de companheirismo. Aos dias de bar, dias de campo, dias de stress com trabalho e provas, dias de risos e até os dias de brigas. Obrigada por conviver comigo, dividir segredos e compartilhar dos mesmos sonhos.

Ao meu orientador, Ricardo, por aceitar me orientar. Pelo conhecimento, ajuda e sabedoria que me foi transmitido. Ao professor Paulo da UFSC, pelas análises do MET.

Aos meus amigos de grupo, Gabriel e Gustavo, por todas as zoeiras (que não foram poucas), as saídas de campo, alegrias e até os momentos de desânimo e raiva que passamos juntos (que também não foram poucos): #aquitem. Às amigas de curso, que estiverem presentes nesta trajetória, especialmente: Débs, Kim, Adri, Ana Pig e Bia, obrigada pelos momentos extrovertidos.

A todos os colegas do LABIM, pela convivência durante estes anos, as amizades que fiz e às pessoas que passaram pelo lab, pelas risadas e músicas nas tardes do lab, e por todo ensinamento que me foi passado e compartilhado. Especialmente à Bethina, por ser tão querida me ensinando sobre as células e por sempre sanar minhas dúvidas. Ao Johnny, pelas explicações sobre nanopartículas, pelas loucuras e risadas durante as sínteses.

Aos meus amigos do Turrrrvo, pelos churras, bebedeiras, filosofias e loucurada, e por permitirem tornar essa fase mais fácil.

Agradeço ainda, alguns professores, por passarem seu conhecimento ao longo da graduação e por fazerem parte desta conquista.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

– Carl Sagan.

RESUMO

O avanço da nanotecnologia nas últimas décadas tem possibilitado a descoberta de novos materiais, para as mais diversas áreas, como a nanomedicina. A utilização de nanopartículas de ouro (GNPs) é evidenciada em diagnósticos e terapias no tratamento do câncer, tais como entrega de fármacos e drogas, terapia gênica, entre outros fatores. Devido ao fato de poderem ser reduzidos ao tamanho de biomoléculas, possuem fácil assimilação aos sistemas biológicos se tornando propícios no tratamento tumoral, levando os fármacos às células cancerígenas, evitando que as células saudáveis sejam atingidas. Considerando a utilização das GNPs na nanomedicina, este trabalho visa caracterizar as GNPs, avaliar a citotoxicidade das GNPs em células cancerígenas de melanoma B16F10 e células de câncer cervical HeLa, conforme o tamanho e a concentração em que as GNPs se encontram, realizado pelo ensaio de citotoxicidade pelo reagente alamar blue e ainda determinar a concentração inibidora de 50% (IC₅₀) das células. As duas linhagens celulares foram cultivadas em garrafas com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino, e quando crescidas, foram transferidas para microplacas de cultura de 96 poços, realizando a diluição seriada onde foram expostas por 24h às GNPs. Após esse período, a viabilidade celular foi medida pelo reagente Alamar Blue. As GNPs utilizadas foram sintetizadas pelo método descrito por Turkevich (1951) e caracterizadas através das análises de UV-Visível e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os resultados demonstraram que o UV-VIS das GNPs estavam entre 520 a 545 nm, tamanho característico das GNPs de 10, 20 e 30 nm. O MET comprovou o tamanho das GNPs, assim como a morfologia esférica de cada GNP. A citotoxicidade celular na linhagem HeLa, demonstrou que, no geral, as GNPs de 20 nm foram as mais tóxicas, onde na menor concentração (2,2 µg/mL) já apresentou 50% de mortalidade celular. Em contrapartida, na linhagem B16F10, as GNPs de 20 nm na menor concentração (2,2 µg/mL) foi a menos tóxica, ao contrário das GNPs de 10 nm que se demonstraram mais tóxicas na maior (70 µg/mL) e menor concentração (2,2 µg/mL). A IC₅₀ demonstrou que para as células B16F10 é preciso uma concentração maior ou igual a 70 µg/mL para ocorrer 50% de mortalidade celular, ao contrário das células HeLa que já nas concentrações menores apresentou mortalidade celular. Em suma, pode-se concluir que a citotoxicidade celular das GNPs, são diferentes dependendo dos tamanhos em que são sintetizadas e das concentrações utilizadas, assim como as linhagens celulares utilizadas.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Células tumorais. Viabilidade celular. Ensaio alamar blue.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 NANOTECNOLOGIA.....	8
1.1.1 Nanopartículas de ouro	9
1.1.1.1 Nanotoxicidade.....	10
1.2 CÂNCER	11
1.2.1 Câncer de pele do tipo melanoma	12
1.2.2 Câncer cervical	12
1.2.3 Tratamentos de cânceres	13
2 OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	16
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	17
3.2.1 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	17
3.2.2 Microscópio eletrônico de transmissão (MET)	17
3.3 ENSAIO <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAR A CITOTOXICIDADE DAS GNPs.....	18
3.3.1 Linhagens celulares	18
3.3.2 Cultura das células	18
3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR ALAMAR BLUE.....	20
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4 RESULTADOS	22
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	22
4.1.1 Aparência das nanopartículas	22
4.1.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	22
4.1.3 Microscópio eletrônico de transmissão (MET)	23
4.2 TOXICIDADE DAS GNPs EM CÉLULAS TUMORAIS	24
4.2.1 Tamanho e concentração das GNPs	24
5 DISCUSSÃO	28
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	28
5.1.1 Aparência das GNPs	28
5.1.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	28

5.2 CITOTOXICIDADE DAS GNPs EM CÉLULAS TUMORAIS.....	29
5.2.1 Tamanho e concentração das GNPs	29
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA

A palavra “nano” tem origem grega e se refere a um tamanho mil vezes menor que um micron (MANSOORI, 2002). A nanotecnologia é uma ciência transdisciplinar, que estuda a manipulação da matéria em escala nanométrica (que possui entre 1 a 100 nanômetros), onde as características físico-químicas, eletrônicas, magnéticas, ópticas, mecânicas e comportamentais são diferentes das apresentadas quando a matéria se encontra em escala maior (ROSSI-BERGMANN, 2008; RAGHAVENDRA et al., 2014).

Ao decorrer do tempo, o estudo com materiais em nanoescala vem ganhando atenção, devido a essas estruturas permitirem exploração e manipulação das propriedades químicas, físicas e biológicas (MANSOORI, 2002). Atualmente, estes materiais são considerados como localizados “na fronteira dos menores dispositivos feitos pelo homem e as maiores moléculas de sistemas vivos” (MANSOORI, 2002).

Existem nanopartículas (NPs) de metais nobres, que apresentam características chamadas de plasmônicas, onde se diferenciam pelos pontos quânticos semicondutores, que apresentam uma ressonância plasmônica de superfície (SPR) particular (HUANG; EL-SAYED, 2010). A SPR é produto do confinamento de fótons a um pequeno tamanho de partícula, e resulta em um aumento das propriedades radioativas e não radioativas das nanopartículas, possibilitando o maior número de utilizações na biologia e medicina (HUANG; EL-SAYED, 2010).

O campo de aplicação da nanotecnologia é vasto (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014). Na área da saúde, é evidenciado na nanomedicina através de diagnósticos, monitoramento, prevenção, controle e tratamento em sistemas biológicos, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida das pessoas (FREITAS, 2005). Dentre as subáreas mais destacadas de aplicações nesse ramo estão a entrega e descoberta de fármacos, nanoimplantes, imagenologia, *nanoarrays* e terapia celular/gênica (FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2014). Os usos e avanços dessas áreas, só foram possíveis devido a diferentes tipos de nanomateriais, como por exemplo as NPs metálicas (XU; STEVENS; CORTIE, 2004).

Dentre as NPs metálicas, as mais estudadas são as de prata e ouro, sendo que estas podem ser obtidas através de diversos reagentes, em diferentes tamanhos e formas (RAGHAVENDRA et al., 2014). As formas mais clássicas apresentadas são as formas de esferas, fios, hastes ou tubos (RAGHAVENDRA et al., 2014).

1.1.1 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (GNPs, do inglês *Gold Nanoparticles*), são amplamente estudadas para diferentes aplicações, principalmente em estudos envolvendo terapias e diagnósticos de câncer (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014).

As GNPs têm como características a facilidade de poderem ser reduzidas a tamanhos que correspondem ao das biomoléculas, como DNA e proteínas, facilitando assim, a sua assimilação a sistemas biológicos (RAGHAVENDRA et al., 2014). As GNPs apresentam ainda, facilidade na sua síntese e nas modificações de sua superfície e propriedades ópticas (HUANG; EL-SAYED, 2010).

Na área farmacológica, as GNPs surgem como carreadores de princípios ativos (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014). Graças a sua capacidade de atravessar as membranas celulares, possivelmente pelo fato de ter interação com lipídios da superfície celular, as GNPs vêm sendo muito estudadas na coadministração com fármacos proteicos (RAGHAVENDRA et al., 2014; SHRIKHANDE et al., 2015). Sabe-se que a monodispersidade e o tamanho são fatores importantes para a administração de um fármaco (RAGHAVENDRA et al., 2014), e por este motivo, as GNPs tornam-se eficientes carreadores, capazes de proporcionar a entrega do fármaco ou de uma biomolécula ao seu alvo biológico, tanto por estímulos externos, como por estímulos internos (GHOSH et al., 2008).

Sabe-se ainda, que na área imunológica as GNPs são capazes de alterar as vias de sinalização apoptótica, o funcionamento normal e modular o estado redox das células (GAO et al., 2011; BIRHANU et al., 2017). Assim, as GNPs são consideradas propícias no transporte de moléculas antineoplásicas para o tratamento tumoral, levando os antineoplásicos diretamente à célula cancerígena, evitando com que as células normais sejam atacadas pelo fármaco (GAO et al., 2011; BIRHANU et al., 2017), minimizando ou removendo os efeitos secundários em locais não alvo (BHOWMIK et al., 2017). Por isso, as GNPs são evidenciadas como grande

promessa, visando trazer avanços significativos no tratamento, diagnósticos e monitoramento do câncer (WANG; THANOU, 2010; BHOWMIK et al., 2017).

Apesar dos benefícios apresentados em relação às GNPs, vale ressaltar, que a estabilidade dessas moléculas merece uma atenção especial, pois em alguns sistemas fisiológicos podem apresentar concentrações séricas e iônicas altas, e isso pode alterar a estabilidade de determinados ligantes das GNPs, acarretando na agregação das mesmas (DREADEN et al., 2011). A estabilidade das GNPs, de diâmetros médio entre 12-50 nm, são obtidas através do revestimento com íons de citrato (ZHU et al., 2003), sendo esse o mais comumente utilizado nas sínteses de GNPs por meio da interação eletrostática mútua, ou seja, entre GNPs vizinhas e a carga superficial negativa da camada de citrato (BREWER et al., 2005).

1.1.1.1 Nanotoxicidade

Ainda que exista a possibilidade de associação das GNPs às moléculas e fármacos específicos, a disponibilidade e biodispersidade desses nanomateriais em sistemas biológicos ainda é restrita (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014). Schrand et al. (2010), ressaltam que diversos parâmetros, como a forma, o tamanho e as propriedades físico-químicas podem tornar os nanomateriais altamente reativos e desestabilizar a homeostase dos sistemas biológicos. Com isso, estudos *in vitro* podem agir como um método de pré-seleção para avaliar os bio-efeitos das NPs (SCHRAND et al., 2010). Em ensaios de toxicidade, geralmente, as doses selecionadas podem representar um intervalo de efeitos mínimos até as concentrações que a toxicidade se torna evidente (SCHRAND et al., 2010).

Sabe-se que as NPs podem entrar ou interagir nas células, tanto por endocitose ou pela penetração direta nas membranas celulares (MAHMOOD et al., 2009). Onde, devido a essas interações NPs-células, assim como a ampla aplicação das GNPs na biologia e medicina, a citotoxicidade das GNPs tornou-se uma das preocupações mais importantes (DU et al., 2012). Com isso, as metodologias e detalhes dos experimentos de toxicidade dos nanomateriais, deve ser levado em conta, principalmente para futuras utilizações em diagnósticos e tratamento de câncer (WANG; THANOU, 2010; CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014; BHOWMIK et al., 2017).

1.2 CÂNCER

Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization* - WHO), cerca de 8,8 milhões de pessoas em todo o mundo morreram de câncer em 2015 (uma estimativa de 1 a cada 6 das mortes globais) (WHO, 2017). Visto isso, o câncer é considerado uma das principais causas de mortalidade no mundo (IARC, 2017). Até 2030, espera-se que o número aumente para 21,7 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes ocasionadas pelo câncer a cada ano (ACS, 2017a).

De forma geral, o câncer é uma desordem no crescimento celular, de modo que estas células começam a invadir, e se espalhar para outras regiões do corpo, como tecidos e órgãos (INCA, 2017a; NCI, 2017a). Estas células dividem-se rapidamente, tornando-se incontroláveis e agressivas, resultando na formação de tumores malignos (INCA, 2017a; HEIDEN; DEBERARDINIS, 2017). À medida que esses tumores malignos aumentam, algumas células podem formar novos tumores longe do seu ponto de origem, devido ao rompimento e dispersão dessas células através do sistema linfático ou sangue (NCI, 2017a).

As causas do câncer podem ser internas (geneticamente pré-determinadas) ou externas (ambiente e hábitos ou costumes), e ainda podem estar inter-relacionadas (INCA, 2017a). As causas internas estão relacionadas às mudanças genéticas que podem ser herdadas, como também podem surgir durante a vida como resultado de erros que ocorrem à medida que as células se dividem ou por danos no DNA causados por alguma exposição ambiental (NCI, 2017a). Essas exposições podem ser causadas por radiação, produtos químicos, raios solares ultravioletas, entre outros fatores (NCI, 2017a).

Há mais de 100 diferentes tipos de câncer, resultantes dos vários tipos de células presentes no corpo. Eles possuem a capacidade de invadir órgãos e tecidos vizinhos ou distantes, conhecido como metástases, graças a sua velocidade de multiplicação celular (INCA, 2017a). Os tipos de câncer geralmente são nomeados conforme os órgãos ou tecidos onde se formam (NCI, 2017a). Dentre os diferentes tipos de cânceres estão o câncer de pele do tipo melanoma e o câncer cervical.

1.2.1 Câncer de pele do tipo melanoma

O câncer de pele é o tipo mais comum de câncer, e normalmente se desenvolve no tecido que foi exposta à luz solar, mas pode ocorrer em qualquer lugar do corpo (ACS, 2017b; NCI, 2017b; MICHAEL; MERLINO, 2017). A pele possui várias camadas e o câncer de pele inicia-se na epiderme, a camada mais externa, sendo esta camada composta de células basais, células escamosas e melanócitos (NCI, 2017b).

Existem diversos tipos de câncer de pele. Os cânceres de pele do tipo não melanoma acometem células basais e células escamosas (ACS, 2017b). Esse tipo de câncer habitualmente responde ao tratamento e raramente se espalha para outras partes do corpo (ACS, 2017b). Já o câncer de pele do tipo melanoma é o câncer mais agressivo, quando comparado aos outros cânceres de pele. Este câncer quando não diagnosticado precocemente, é possível que invada os tecidos próximos e se espalhe para outras partes do corpo (NCI, 2017b).

Ainda, o melanoma é um tipo de câncer de pele originado pelos melanócitos (células produtoras de melanina: substância que determina a cor da pele), sendo predominante em adultos brancos (ACS, 2017b; INCA, 2017b) e mais comum em homens do que em mulheres (NCI, 2017b).

No Brasil, o melanoma é o câncer mais frequente, correspondendo a 30% de todos os tumores malignos registrados e embora seja considerado o mais grave pela sua alta possibilidade de metástase, representa 3% de neoplasias malignas do órgão (INCA, 2017b).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a cada ano o número de casos de melanoma vem aumentando, sendo que o Brasil registra anualmente um total de mortes de 1.547 (903 para homens e 644 para mulheres) e uma estimativa de 5.670 novos casos (3.000 para homens, e 2.670 para mulheres) (INCA, 2017b).

1.2.2 Câncer cervical

O câncer cervical é também conhecido como câncer de colo do útero. O colo do útero é a região estreita e inferior do útero (onde cresce o feto) e é a região que liga o útero à vagina (canal do parto) (ACS, 2017c; NCI, 2017c). Dentre os tipos de câncer cervical estão o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma (ACS, 2017c).

“O carcinoma de células escamosas inicia-se nas células planas e finas que alinham o colo do útero. O adenocarcinoma inicia-se em células cervicais que fazem muco e outros fluidos” (NCI, 2017b).

O câncer cervical é causado por infecções duradouras com certos tipos de Papilomavírus Humano – HPV (INCA, 2017c; NCI, 2017c), e estes causam quase todos os casos de câncer cervical (NCI, 2017c). Na maioria das vezes, a infecção genital pelo vírus não causa doença, sendo que além disso, existem vacinas que protegem contra a infecção por HPV, reduzindo o risco de desenvolver a doença (ACS, 2017c; NCI, 2017c). No entanto, há ainda casos que podem acontecer alterações celulares e evoluir para o câncer (ACS, 2017c; INCA, 2017c). Estas alterações celulares podem ser descobertas pelo exame preventivo pela coloração Papanicolau e na maioria dos casos, podem ser tratadas e curáveis (INCA, 2017c; NCI, 2017c).

No Brasil, é o terceiro tumor mais frequente nas mulheres, ficando atrás apenas do câncer de colorretal e de mama e é a quarta causa de morte na população feminina (INCA, 2017c). De acordo com dados do INCA de 2016, o Brasil registra 16.340 novos casos anualmente, com um registro de 5.430 mortes (INCA, 2017c). Apesar disso, o Brasil vem avançando no estudo e diagnóstico precoce deste tipo de câncer. Um fato que mostra que o país avançou no diagnóstico precoce da doença, é que em 1990, 70% dos casos eram considerados como doença invasiva, um estágio mais agressivo. Hoje, 44% dos casos são lesões precursoras da doença, chamada *in situ* (lesão localizada) (INCA, 2017c).

1.2.3 Tratamentos de cânceres

Os tratamentos mais indicados para os cânceres são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, que podem ser utilizadas conforme o estágio em que o câncer se apresenta (INCA, 2017c; AJCC, 2017). No entanto, estes tratamentos quando a curto e longo prazo acarretam efeitos adversos (MAUREA et al., 2010). Atualmente, os principais problemas são que os quimioterápicos para o câncer disponíveis no mercado não têm seletividade ao alvo, ou seja, a citotoxicidade destes fármacos atingem também células saudáveis (BIRHANU et al., 2017).

Pelo fato de atualmente não existir um antineoplásico ideal, existe uma grande busca para encontrar e produzir tratamentos terapêuticos antineoplásicos

mais eficientes, para que a terapia aja apenas nas células cancerígenas, levando-as à uma parada de crescimento e apoptose, sem prejudicar as células normais do organismo (KULHARI et al., 2014; WANG et al., 2014). Desta maneira haveria uma redução nos efeitos colaterais dos tratamentos (KULHARI et al., 2014).

Neste contexto, as NPs surgem como uma das alternativas para o tratamento de câncer, pois graças às suas características de permeabilização e retenção, pode-se direcioná-las junto com agente antineoplásico aos tumores (WANG; THANOU, 2010). Deste modo, espera-se que a maioria das NPs se acumulem nos tumores, evitando atingir as células saudáveis. O acúmulo das NPs é possível por conta da alta permeabilidade dos vasos sanguíneos, resultado da angiogênese rápida causada por tumores metastáticos (WANG; THANOU, 2010). Além disso, os tumores apresentam drenagem linfática disfuncional, o que ajuda a retenção das NPs no tumor por tempo suficiente, para que essas se desintegrem e ocorra a liberação do fármaco no local (WANG; THANOU, 2010).

Portanto, devido ao potencial das GNPs estarem entre as novas estratégias de liberação de fármacos (ATHAWALE et al., 2014) e apresentarem uma vasta série de aplicações biológicas (RAGHAVENDRA et al., 2014), muitos estudos vêm dando atenção a elas para o tratamento de cânceres (ATHAWALE et al., 2014), e se mostrando assim como uma grande promessa terapêutica (BHOWMIK et al., 2017).

No entanto, ainda se faz necessário um melhor entendimento sobre a caracterização e propriedades ideais das GNPs, para que estas possam atuar nas células tumorais. Desta forma, busca-se um maior conhecimento sobre a interação de GNPs e células cancerígenas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das GNPs recobertas por citrato em células cancerígenas de melanoma B16F10 e de câncer cervical HeLa, por meio do ensaio de citotoxicidade pelo reagente Alamar Blue.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a estrutura das GNPs recobertas com citrato de diferentes tamanhos.
- Identificar em qual tamanho as GNPs apresentam maior citotoxicidade celular.
- Verificar em qual concentração das GNPs apresentam maior citotoxicidade celular.
- Determinar a IC_{50} das concentrações de GNP nas duas linhagens celulares.
- Verificar e comparar a citotoxicidade das GNPs em células cancerígenas B16F10 e HeLa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos e testes realizados foram feitos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LABIM da UNESC, pelo grupo de pesquisa de “Biotecnologia Peptídica aplicada na produção de novos fármacos” (BIOTECH).

3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As GNPs de tamanho de 10, 20 e 30 nanômetros (nm), foram sintetizadas pelo método descrito por Turkevich (1951), com algumas alterações. A redução química do precursor metálico ácido auroclorídrico (HAuCl_4 – diluído em HCl) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) ocorreu juntamente com o redutor e estabilizante citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, SP, Brasil). Pipetou-se 34 μL de ácido auroclorídrico (1 mM) em um balão volumétrico de 100 ml, completando-o com água ultra pura (Milli-Q) e aquecendo-o até 90 °C (até a ebulição) em um balão de fundo redondo (125 ml) de 3 bocas, sob agitação magnética à 700 rpm.

O controle dimensional das GNPs é efetuado variando-se a concentração do agente redutor, para cada GNP. Para a GNP de 10 nm, é utilizado 1 g de solução de citrato de sódio (0,136 M), diluído em 25 ml de água ultrapura; Para a GNP de 20 nm, 0,250 g (0,034 M) é diluído em 25 ml de água ultra pura; Para a GNPs de 30 nm, 0,250 g (0,0085 M) é diluído em 100 ml de água ultra pura. Sendo que para as GNPs de 20 e 30 nm, o citrato é antes aquecido a uma temperatura de 50 °C.

Ao atingir a temperatura, foram adicionados 5 ml da solução de citrato de sódio preparada ao ácido auroclorídrico, deixando reagir por cerca de 15 minutos. Ao final obtêm-se uma coloração para cada tamanho de GNPs. Deixou-se esfriar em temperatura ambiente. Todas as GNPs foram armazenadas em tubos revestidos com papel alumínio.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

3.2.1 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Pela análise qualitativa do espectro UV-Vis podemos ter uma estimativa do tamanho médio das partículas. “O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu ‘espectro de absorção’” (PEREIRA et al., 2013). Onde, a luz ao passar por alguma substância, tem parte da energia absorvida (absorbância) e a energia radiante não pode produzir efeito sem ser absorvida (HARRIS, 2005).

Com isso, após as sínteses, as soluções de GNPs foram caracterizadas utilizando a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), pelo monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR-6000 (Shimadzu).

As medições da banda de SRP, foram realizadas a temperatura ambiente no espectrofotômetro usando uma cubeta de quartzo de 1 cm de diâmetro, contendo alíquotas de 2 mL com cada uma das soluções.

3.2.2 Microscópio eletrônico de transmissão (MET)

A determinação do tamanho e a morfologia das GNPs recobertas por citrato deu-se por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), realizado pelo professor Dr. Paulo Emilio Feuser no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Após as sínteses e as leituras do UV-Vis, uma gota da solução foi adicionada em um grid de cobre (300 *mesh*) recoberto com uma fina camada de carbono. A secagem foi realizada a temperatura ambiente (24 h). Após 24 h, as imagens foram obtidas.

3.3 ENSAIO *IN VITRO* PARA AVALIAR A CITOTOXICIDADE DAS GNPs

3.3.1 Linhagens celulares

As células utilizadas para avaliar a citotoxicidade das GNPs foram células cancerígenas do tipo melanoma murino (B16F10) e células de câncer cervical humano (HeLa). A linhagem celular HeLa foi adquirida do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas da UFMG, cedidas pelo professor Dr. Carlos Chavez Olórtegui. A linhagem celular B16F10 foi cedida pela professora Dr. Gabriela Trevisan da UFSM.

3.3.2 Cultura das células

Todos os procedimentos descritos a seguir foram executados de forma idêntica para as duas linhagens celulares.

As células foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm², com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/L), 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (10 U.L/mL) e 10% de soro fetal bovino (meio completo). Para o crescimento e adesão celular, as mesmas foram mantidas em uma incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, com trocas de meio realizadas em dias alternados, até se obter a quantidade de células suficiente para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao obter a quantidade necessária de células, as mesmas foram tripsinizadas e colocadas em uma câmara *Neubauer* para posterior contagem no microscópio. A concentração de células viáveis foi determinada de acordo com a equação a seguir:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de poços a serem utilizados} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{\text{Média do n}^{\circ} \text{ de células contadas por quadrante} \times 10^4}$$

Em seguida, completou-se aos tubos falcon com células, 6 mL de meio DMEM completo, à fim de utilizar 100 µL em cada poço.

Após a quantificação, as células foram colocadas em microplacas esterilizadas de cultura contendo 96 poços. A microplaca é organizada em oito séries identificadas de A até H, que possuem doze poços numerados de 1 a 12. Foram

desconsideradas as bordas da microplaca, sendo utilizado 60 poços com uma concentração final de células de 1.10^4 /poço e incubadas por 24 horas em DMEM completo, a fim de proporcionar a aderência das células. Cada linha (B-G) correspondeu a uma concentração, menos para os controles negativo e positivo.

O controle positivo do teste foi realizado utilizando apenas células incubadas com DMEM completo (sem adição de GNPs). O controle negativo foi realizado a partir da incubação de DMEM completo (sem GNPs e sem células), mimetizando 100% de células mortas.

Decorrido o tempo necessário para a aderência das células na microplaca, retirou-se o meio completo de cada poço e colocou-se 100 μ L de meio incompleto em cada poço. Depois, foram adicionados 100 μ L da solução de GNPs no primeiro poço, obtendo a concentração inicial de 70 μ g/mL. A partir destas concentrações foi realizada a diluição seriada (Tabela 1), homogeneizando e transferindo 100 μ L do primeiro poço para o poço abaixo, e assim sucessivamente, descartando os 100 μ L finais.

Tabela 1 – Valores de concentração da diluição seriada das GNPs de 10, 20 e 30 nm, utilizadas nas células cancerígenas de melanoma B16F10 e de câncer cervical HeLa.

GNPs de 10, 20 e 30 nm
70 μ g/mL
35 μ g/mL
17,5 μ g/mL
8,7 μ g/mL
4,4 μ g/mL
2,2 μ g/mL

Fonte: Do autor, 2017.

A microplaca foi incubada por mais 24 horas em incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C.

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR ALAMAR BLUE

A viabilidade das células cancerígenas B16F10 e HeLa foi medida pelo reagente Alamar blue.

Alamar Blue é um corante solúvel em água que não apresenta citotoxicidade e é muito estável, sendo considerado um teste superior ao MTT (HENRIKSSON et al., 2006). Também proporciona uma maior vantagem na sensibilidade, podendo detectar baixas densidades de células, como 200 μL /poço (PAGÉ; PAGÉ; NOËL, 1993). É um indicador fluorescente/colorimétrico, onde a sua forma oxidada entra no citosol e é convertida por enzimas mitocondriais (RIBEIRO et al., 2004). A forma oxidada do corante possui coloração azul, indicando a não fluorescência, ou seja, células não viáveis. A coloração rosa é a forma reduzida do corante, relativa à sua fluorescência, indicando a presença de células viáveis (RIBEIRO et al., 2004; HENRIKSSON et al., 2006).

Após as 24 h de incubação, preparou-se uma solução diluindo 1,8 mL de alamar blue em 10,8 mL de meio incompleto, e colocou-se 100 μL /poço desta mistura na microplaca e a mesma foi incubada no escuro por 3 horas.

Posteriormente a este período, retirou-se todo o conteúdo dos poços e transferiu-se a uma nova microplaca esterilizada. As leituras das células foram realizadas em espectrofotômetro (com absorbâncias de 570 e 600 nm). A viabilidade celular foi determinada pela comparação dos resultados das absorbâncias dos testes (onde há GNPs) com as absorbâncias do controle positivo (considerado como 100% de viabilidade celular).

Ainda, após as análises, foi determinada a concentração inibidora de 50% (IC_{50}) das células (HeLa e B16F10), dos diferentes tamanhos e concentrações de GNP.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicatas, para cada tamanho de GNPs e para os controles. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem, e o resultados foram demonstrados em gráficos.

Para determinação da IC₅₀, foi realizado a log de cada concentração no Excel, e posteriormente analisado a IC₅₀ no programa *GraphPad Prism* versão 5.0, com confiabilidade $p < 0,05$.

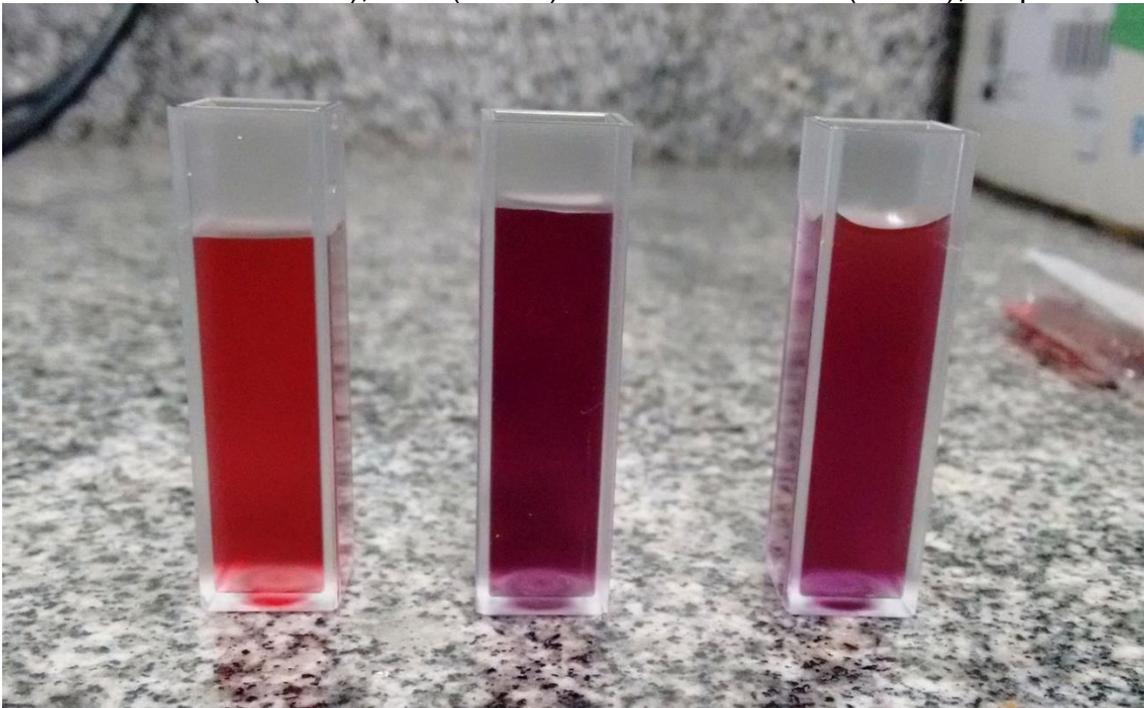
4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.1.1 Aparência das nanopartículas

As soluções de GNPs apresentaram coloração vermelha, roxo e roxo-caramelado (Figura 1).

Figura 1– Imagens das colorações das nanopartículas de ouro, da esquerda para a direita: vermelho (10 nm), roxo (20 nm) e roxo-caramelado (30 nm), respectivamente.

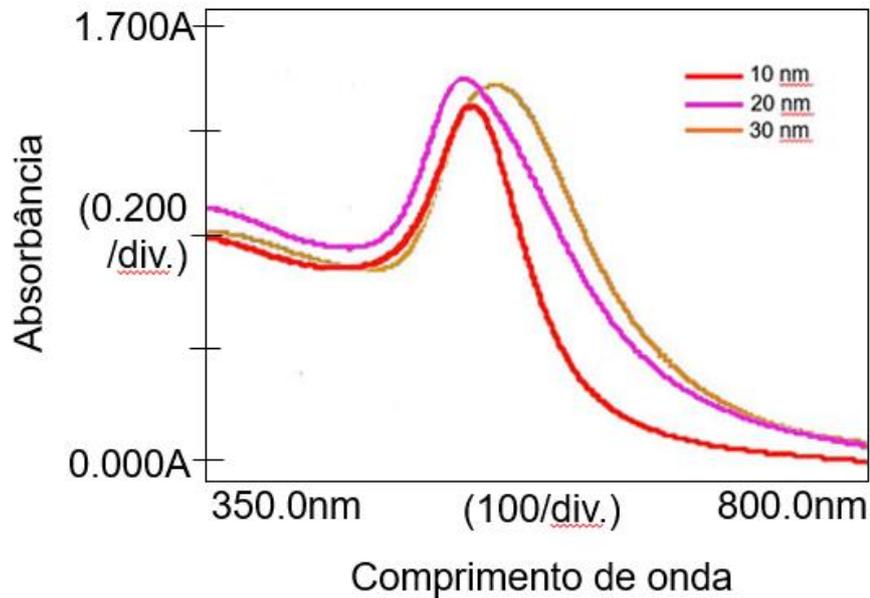


Fonte: Do autor, 2017

4.1.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As GNPs foram caracterizadas quanto ao seu tamanho no espectro de UV-Vis (Figura 2), relacionando a absorbância com comprimento de onda. As GNPs apresentaram comprimento de onda entre 520 a 545 nm, aproximadamente.

Figura 2 – Espectros de absorvância e comprimento de onda de UV-Vis, de diferentes tamanhos de nanopartículas de ouro. Em vermelho: 10 nanômetros; Roxo: 20 nanômetros e em Caramelo: 30 nanômetros.



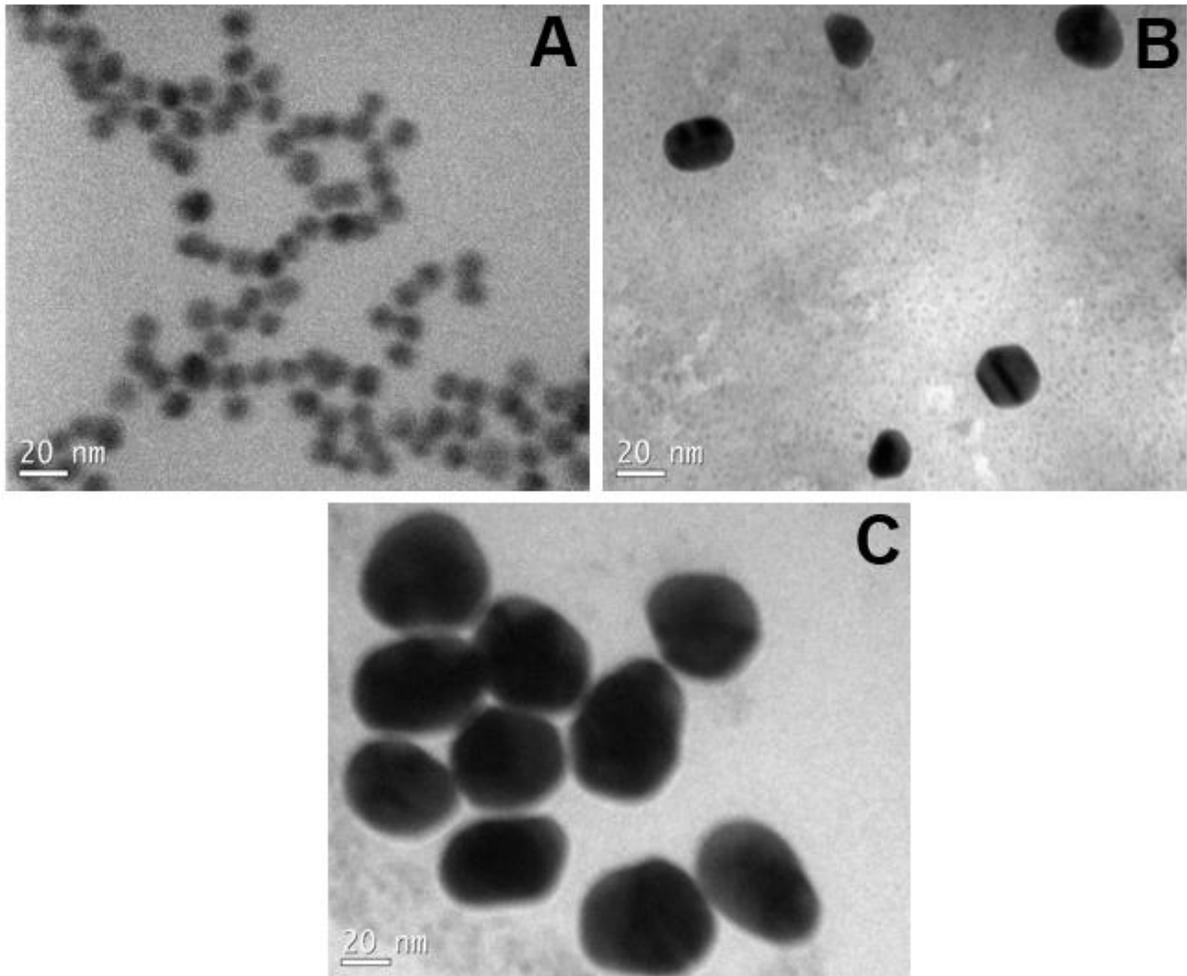
Fonte: Do autor, 2017.

As GNPs de 10 nm apresentaram absorvância máxima (Abs_{max}) de 1.374, e comprimento de onda no máximo de absorção (λ_{max}) de 519.50 nm. As GNPs de 20 nm apresentaram Abs_{max} de 1.293 e λ_{max} de 525.00 nm e por último, as GNPs de 30 nm apresentaram Abs_{max} 1.542 e λ_{max} 543.5 nm,

4.1.3 Microscópio eletrônico de transmissão (MET)

A caracterização das GNPs por MET confirmaram as características obtidas no UV-Vis e também em relação a aparência das mesmas. A Figura 3, mostra que as GNPs apresentaram uma forma esférica. O tamanho do diâmetro foi obtido com imagem em escala de 20 nm, onde as GNPs apresentaram tamanho de 10 (Figura 3A), 20 (Figura 3B) e 30 nm (Figura 3C).

Figura 3 – Imagens das GNPs obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Onde, o tamanho corresponde: A: GNP de 10 nm; B: GNP de 20 nm e C: GNP de 30 nm.



Fonte: Do autor, 2017.

4.2 TOXICIDADE DAS GNPs EM CÉLULAS TUMORAIS

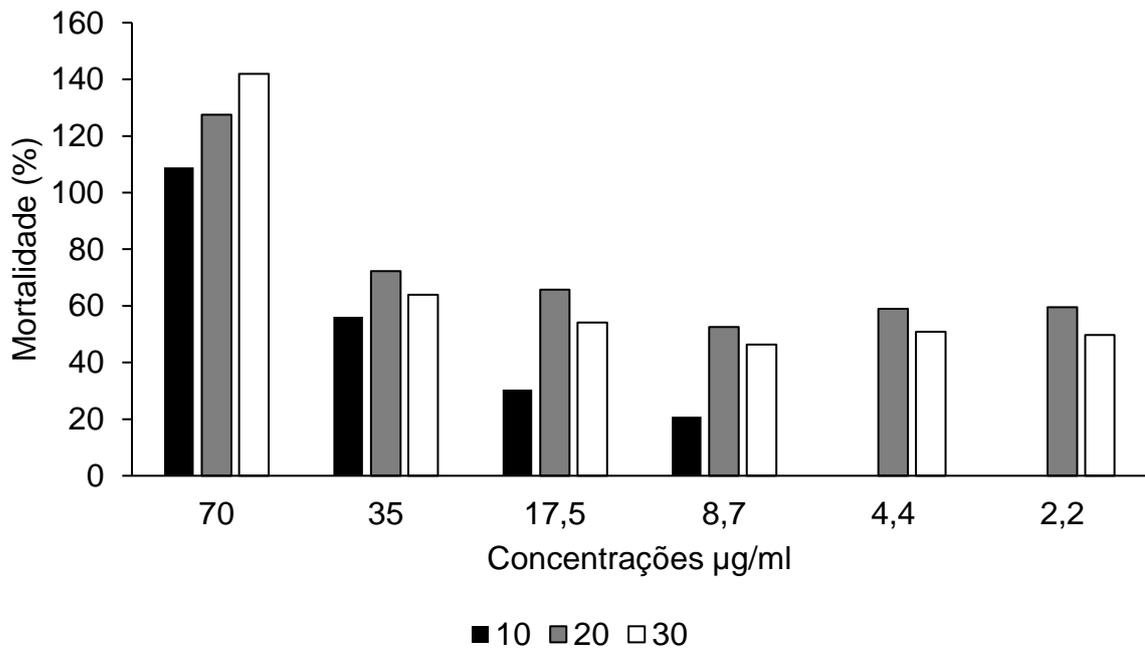
4.2.1 Tamanho e concentração das GNPs

Todos os tamanhos de GNPs (10, 20 e 30 nm) utilizados no teste de citotoxicidade das duas linhagens celulares, foram testados seguindo a diluição seriada.

Na linhagem celular HeLa (Figura 4), as GNPs de tamanho de 10 nm foram as que menos apresentaram toxicidade em todas as concentrações, quando comparada às de tamanhos de 20 e 30 nm. As GNPs de 20 nm foram as mais tóxicas das GNPs. As GNPs de 30 nm quando comparadas às GNPs de 20 nm, apresentaram maior citotoxicidade apenas na concentração 70 $\mu\text{g/mL}$. As células HeLa apesar de

terem um maior percentual de células mortas, quando comparadas à linhagem B16F10 (Figura 5), as GNPs de 10 nm na concentração de 4,4 µg/mL e 2,2 µg/mL, não ocasionaram mortalidade celular.

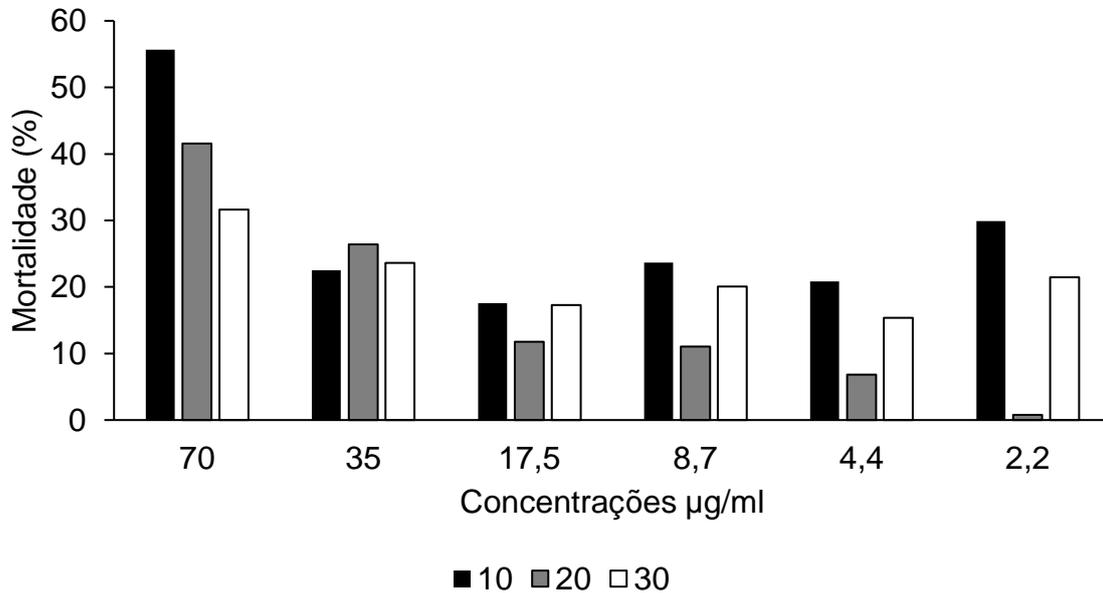
Figura 4 - Citotoxicidade dos diferentes tamanhos de GNPs em células de câncer cervical (HeLa), conforme as concentrações.



Fonte: Do autor, 2017.

Na linhagem celular B16F10 (Figura 5), as GNPs de 10 nm na concentração de 70 µg/mL e 2,2 µg/mL apresentaram maior citotoxicidade do que as outras GNPs. As GNPs de 20 nm quando comparadas as de 30 nm foram as que apresentaram maior toxicidade nas concentrações mais altas (70 e 35 µg/mL). Contudo, as GNPs de 30 nm apresentaram maior toxicidade que as GNPs de 20 nm nas concentrações baixas (17,5 a 2,2 µg/mL). Ainda, as GNPs de 20 nm na concentração de 2,2 µg/mL obtiveram a mais baixa porcentagem de mortalidade celular, com taxa de 0,79%, sendo o único tamanho e concentração considerado não tóxico. Todas as demais concentrações e tamanhos causaram mortalidade celular.

Figura 5 - Citotoxicidade dos diferentes tamanhos de GNPs, em células de câncer de melanoma (B16F10), conforme as concentrações.



Fonte: Do autor, 2017.

Para determinar em qual concentração ocorreu 50% de mortalidade celular, realizou-se a IC_{50} de cada concentração e respectivos tamanhos, onde podem ser observados na Tabela 2.

As células da linhagem B16F10 que foram submetidas às GNPs de 10 nm necessitam de uma concentração de 70 µg/mL para causar a mortalidade de 50% das células, como também observado na Figura 5. Para as GNPs de 20 e 30 nm, o IC_{50} são as concentrações maiores que 70 µg/mL. Vale ressaltar que, para as GNPs de 20 e 30 nm, na linhagem de câncer do tipo melanoma B16F10, as IC_{50} ultrapassaram o log da nossa maior concentração (70 µg/mL) e por isso, presume-se que necessita de uma concentração maior que 70 µg/mL.

Tabela 2 – Valores de Concentração Inibidora (IC_{50} - 50% de mortalidade celular) das GNPs de todos os tamanhos (10, 20 e 30 nm), em células HeLa e B16F10.

IC_{50} - B16F10			IC_{50} - HeLa		
10 nm	20 nm	30 nm	10 nm	20 nm	30 nm
70 µg/mL	>70 µg/mL	>70 µg/mL	35 µg/mL	2,2 µg/mL	4,4 µg/mL

Fonte: Do autor, 2017.

Para a linhagem de células HeLa, foram observadas que em menores concentrações já causaram o IC_{50} , quando comparadas às células B16F10. As

concentrações das IC_{50} na linhagem HeLa foram de 35 $\mu\text{g/mL}$ para as GNPs de 10 nm, 2,2 $\mu\text{g/mL}$ para as de 20 nm e 4,4 $\mu\text{g/mL}$ para as de 30 nm (Tabela 2).

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

5.1.1 Aparência das GNPs

Nas GNPs, os *plasmons* (nuvens de elétrons superficiais) estão distribuídos em estruturas de bandas que possuem energias distintas. Assim, a cor de cada GNPs vai depender do tamanho e da densidade de estados eletrônicos (TOMA; BONIFÁCIO, 2005). À medida que o tamanho ou a forma das GNPs mudam, a cor observada também muda (EL-SAYED; EUSTIS, 2006).

As GNPs de 10 nm apresentaram uma coloração de vermelho intenso. Isso ocorre com as GNPs entre 2 e 10 nm devido às transições entre as bandas eletrônicas que acomodam os elétrons superficiais (TOMA; BONIFÁCIO, 2005).

Já as GNPs de 20 e 30 nm apresentaram uma cor roxa e roxo caramelado, respectivamente. As colorações das GNPs maiores mudam “devido ao aumento na densidade de estados eletrônicos e consequente diminuição da energia de transição entre as bandas”, alcançando assim uma cor próxima ao violeta (TOMA; BONIFÁCIO, 2005).

5.1.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As GNPs apresentaram absorvância entre 520 a 545 nm, corroborando com a intensidade *plasmon* ressonante característica das GNPs, geralmente na região de 500 nm a 560 nm (QUADROS et al., 2016).

O máximo de absorção no espectro UV-Vis das soluções coloidais está relacionado ao tamanho, distribuição e concentração média das partículas. A largura da banda de absorção está relacionada à dispersão das partículas. Pode-se notar que o máximo de absorção amostrado foi de 519.5, 525.00 e 543 nm, o que caracteriza GNPs com tamanho aproximado de 10 (HE et al., 2005), 20 (SHILO et al., 2015) e 30, respectivamente. Assim, a técnica de UV-Vis fornece informações importantes para caracterizar as soluções.

5.2 CITOTOXICIDADE DAS GNPs EM CÉLULAS TUMORAIS

5.2.1 Tamanho e concentração das GNPs

Ainda que a nanotecnologia tenha avançado em tratamentos terapêuticos e em diagnósticos, o seu potencial efeito na saúde humana ainda não foi determinado, devido à escassez e controversas de informações sobre os efeitos da toxicidade desses nanomaterias (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014). Em relação às GNPs, tem-se uma preocupação de como essas partículas penetram nas membranas celulares, quando comparado a outros fármacos e moléculas (CANCINO et al., 2011).

Análises *in vitro* ainda que muito utilizadas, resultam em informações pouco precisas e muito contraditórias (VILLIERS; FREITAS; COUDERC, 2010; CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014). Neste estudo, esperava-se que quanto maior o tamanho da GNP e maior a sua concentração, maior seria sua toxicidade. Porém, a variação nos resultados da toxicidade de GNPs testadas *in vitro* demonstram que diversos outros fatores associados, tais como tamanho, forma, revestimento e concentração em que as GNPs se encontram, podem influenciar na toxicidade das GNPs (VILLIERS; FREITAS; COUDERC, 2010), dificultando na obtenção de resultados precisos.

Nesse estudo, GNPs de 10 nm esféricas recobertas com citrato apresentaram maior citotoxicidade na linhagem celular HeLa (IC₅₀: 35 µg/mL) do que na linhagem de câncer de melanoma B16F10 (IC₅₀: 70 µg/mL), quando comparadas. Em um outro estudo, mostrou-se que as GNPs de 6 nm também foram citotóxicas às células HeLa quando incubadas em diferentes concentrações (10, 20 e 30 µg/mL) e tempos de exposição (24 e 48h), quando realizado pelo teste MTT (BORSE; JOSHI; KHAN, 2015). Para células B16F10, Chang et al. (2008), demonstraram que GNPs de 13 nm esféricas recobertas com citrato foram tóxicas. Por sua vez, Mehrnia et al. (2017), observaram que GNPs de 10 nm em diferentes concentrações (0, 5, 12.5, 25 e 50 mg/L), utilizadas em células cancerígenas de mama (MCF-7 e MDA-MB-23) por 24 h, não demonstraram citotoxicidade.

As GNPs esféricas não são consideradas tóxicas, quando usadas em linhagem celular de leucemia humana (K562) e quando apresentadas em tamanhos de 4, 12 e 18 nm, assim como os reagentes de cobertura (glicose, citrato, cisteína, biotina, brometo de cetiltrimetil-amônio), incubadas por 3 dias, com concentração até

150 μM (CONNOR et al., 2005). Em contrapartida, Goodman et al. (2004), consideram as GNPs de 2 nm tóxicas, quando utilizadas em células de fibroblastos (Cos-1) em certas doses. Além disso, o tempo de exposição e dosagens das GNPs às células desses estudos variam, o que dificulta a comparação.

No estudo de Khan et al. (2007), quando as GNPs de 18 nm recobertas com citrato foram usadas em células HeLa, com concentrações de 0.2 à 2 nM, não demonstraram-se tóxicas, diferentemente dos nossos resultados, onde as GNPs de 20 nm apresentaram maior citotoxicidade em células HeLa (IC_{50} : 2,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do que nas células de câncer de melanoma (IC_{50} : >70 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

No trabalho de Patra et al. (2007), GNPs de 33 nm recobertas com citrato foram testadas em três linhagens celulares diferentes (A549, HepG2 e BHK21) e diferentes das células utilizadas nesse estudo, ocorreu morte celular na linhagem de carcinoma de pulmão humano (A549) e não induziu morte celular às outras duas linhagens celulares (HepG2 e BHK21). Já neste trabalho, constatou-se que as GNPs de 30 nm foram mais citotóxicas nas células HeLa (IC_{50} : 4,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do que nas células de câncer de melanoma (IC_{50} : >70 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mostrando que além do tamanho, tipo, concentração e morfologia da NPs, elas apresentam citotoxicidade diferente em linhagens celulares distintas.

Ainda, outro fator que pode alterar na toxicidade celular é o tempo, como visto por Chithrani; Ghazani; Chan (2006), que observaram que GNPs esféricas de 14, 30, 50, 74 e 100 nm recobertas por citrato em células Hela, não apresentaram toxicidade celular, quando incubadas por 6 h, diferentemente dos resultados deste estudo, onde as células quando incubadas por 24 h apresentaram citotoxicidade.

O tamanho e a concentração das partículas e até o tempo de incubação das células submetidas às GNPs, são fatores importantes, pois afetam a difusão entre as NPs, sedimentação e aglomeração e o transporte das NPs para as células durante o teste de citotoxicidade. Além disso, alguns pesquisadores relatam que as GNPs esféricas não são tão citotóxicas, ao contrário dos nanotubos de ouro (FRATODI et al., 2014), ainda, alguns sistemas específicos de entrega de fármacos demonstraram vantagens quando associadas a sistemas esféricos (WANG et al., 2011). Esses achados se fazem importantes ao relacionar tamanho e forma específica para respostas biológicas (FRATODI et al., 2014).

Visto que nossos resultados diferiram entre si, Alkilany; Murphy (2010); Fratodi et al. (2014), ressaltam que os resultados conflitantes podem surgir a partir

das linhagens celulares, variabilidade dos ensaios de toxicidade e propriedades físicas e químicas das GNPs. Com isso, considera-se que o tamanho da partícula desempenha um papel importante, embora que a diferença de tamanho das GNPs utilizadas seja pequena, a resposta geral é significativamente diferente (FRATODI et al., 2014). Hauert; Bhatia (2014), explicam que NPs maiores que 5 nm e menores que 500 nm, podem permanecer mais tempo em circulação e se acumular em tumores sólidos, ainda, o tamanho também limita a capacidade de internalização das NPs para as células (WANG et al., 2011).

Porém, alguns autores também ressaltam que a concentração das GNPs afeta diretamente na toxicidade celular, causando dano na membrana e vazamento do fluido celular, assim como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (VIAL; REIS; OLIVEIRA 2017). Ainda, EROS em alto nível podem gerar danos no DNA ou prejudicar a viabilidade mitocondrial, resultando em morte celular (MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013).

Conseqüentemente, existe na literatura achados diferentes e com isso é difícil a organização dos dados disponíveis, uma vez que existe uma variedade de parâmetros envolvidos, nos diferentes estudos (FRATODI et al., 2014). Essa grande dispersão de dados impossibilita achar correlação razoável, além de que, partículas maiores são mais tóxicas do que as partículas menores (FRATODI et al., 2014).

Como esperado, as duas linhagens de células obtiveram resultados diferentes em relação a citotoxicidade e por este motivo são realizados estudos *in vitro* com diferentes linhagens celulares (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014), a fim de comparar os diferentes padrões de comportamento. Por essa procura de respostas, a citotoxicidade de GNPs tem sido objeto de muitos estudos, tornando-se pré-requisito para futuras análises *in vivo* (VILLIERS; FREITAS; COUDERC, 2010).

Contudo, estudos de citotoxicidade de GNPs em células cancerígenas precisam ser devidamente avaliadas e comparadas, onde cabe ao pesquisador buscar GNPs com concentrações e morfologias adequadas para o tipo celular desejado assim como a finalidade de aplicação. Por exemplo, ao querer utilizar a GNP como carreador de fármacos às células tumorais deve-se optar por GNP não tóxicas. Já em casos de se utilizar as GNPs sozinhas, como agente citotóxico, deve-se optar por GNPs com maior citotoxicidade, afim de matar as células cancerígenas. A escolha da forma, tamanho, concentração, tempo de exposição celular, protocolos de síntese e

seus reagentes e até os testes de viabilidade celular a serem utilizados são essenciais para garantir resultados precisos e sucesso no trabalho.

6 CONCLUSÃO

As GNPs foram sintetizadas com êxito através do método de Turkevich, e caracterizadas satisfatoriamente através das suas colorações e resultados de UV-Vis, que comprovaram as suas cores e picos característicos, respectivamente. Assim também como as imagens obtidas no MET, que confirmaram o tamanho de 10, 20 e 30 nm e a morfologia esférica das GNPs.

Dentre as GNPs, as GNPs de 20 nm foram as que apresentaram maior mortalidade celular nas menores concentrações para a linhagem celular HeLa. No entanto, na linhagem celular de melanoma B16F10, as GNPs de 20 nm, nas menores concentrações apresentaram menor mortalidade celular do que as outras GNPs.

O tamanho e a concentração das GNPs, assim como a linhagem celular utilizada são fatores que afetam a citotoxicidade de uma NP. É de fundamental importância à realização de outros estudos adicionais, como a exposição de GNPs em células saudáveis, assim como estudos para saber como as GNPs se comportam nas células, e para isso, faz-se importante observar se as GNPs entram e ficam nas células, ficam aderidas na membrana celular ou se entram e saem sem prejudicar as células, a fim de compreender ainda mais a forma de ação de GNPs em sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS

ACS – American Cancer Society. **Global Cancer Facts & Figures**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/global.html>>. Acesso em: 26 Jul. 2017a.

ACS – American Cancer Society. **What Is Melanoma Skin Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/what-is-melanoma.html>>. Acesso em: 01 Dez. 2017b.

ACS – American Cancer Society. **What Is Cervical Cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/what-is-cervical-cancer.html>>. Acesso em: 01 Dez. 2017c.

AJCC – American Joint Committee on Cancer. **What is Cancer Staging?** Disponível em: <<https://cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx>>. Acesso em: 01 Dez. 2017.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **J Nanopart Res**. v. 12, p. 2313-2333, 2010.

ATHAWALE, R. B.; JAIN, D. S.; SINGH, K. K.; GUDE, R. P. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. n. 68, p. 231-240, 2014.

BHOWMIK, T.; SAHA, P. P.; SARKAR, A.; GOMES, A. Evaluation of cytotoxicity of a purified venom protein from *Naja kaouthia* (NKCT1) using gold nanoparticles for targeted delivery to cancer cell. **Chemico-Biological Interactions**. n. 261, p. 35-49, 2017.

BIRHANU, G.; JAVAR, H. A.; SEYEDJAFARI, E.; KARIMI, A. Z. Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 88, p. 635–643, 2017.

BORSE, S.; JOSHI, S.; KHAN, A. Enhanced *in vitro* cytotoxicity and cellular uptake of DNA bases functionalized gold nanoparticles in HeLa cell lines. **The Royal Society of Chemistry**. n. 5, p. 13402-13410, 2015.

BREWER, S. C.; GLOMM, W. R.; JOHNSON, M. C.; KNAG, M. K.; FRANZEN, S. Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. **Langmuir**. v. 21, n. 20, p. 9303–9307, 2005.

CANCINO, J.; NOBRE, T. M.; OLIVEIRA-JUNIOR, O. N.; MACHADO, S. A. S.; ZUCOLOTTI, V. A new strategy to investigate the toxicity of nanomaterials using Langmuir monolayers as membrane models. **Nanotoxicology**. p. 1-10, 2011.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quim. Nova**. v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CHANG, M-Y; SHIAU, A-L; CHEN, Y-H; CHANG, C-J; CHEN, H. H-W; WU, C-L. 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.; GAHZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters.** v. 6, n. 4, p. 661-668, 2006.

CONNOR, E. E.; MWAMUKA, J.; GOLE, A.; MURPHY, C. J.; WYATT, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. **Small.** n. 3, p. 325-327, 2005.

DREADEN, E. C.; MACKEY, M. A.; HUANG, X.; KANG, B.; EL-SAYED, M. A. Beating cancer in multiple ways using nanogold. **Chem. Soc.** n. 40, p. 3391-3404, 2011.

DU, L.; MIAO, X.; JIA, H.; GAO, Y.; LIU, K.; ZHANG, X.; LIU, Y. Detection of nitric oxide in macrophage cells for the assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles. **Talanta.** v. 101, p. 11-16, 2012.

EL-SAYED, M. A.; EUSTIS, S. 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.** n. 35, p. 209-217, 2006.

FRATODI, I.; VENDITTI, I.; CAMETTI, C.; RUSSO, M. V. How Toxic are Gold Nanoparticles? The State-of-the-Art. **Nano Research.** v. 8, p. 1-33, 2014.

FREITAS, R. A. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. **International Journal of Surgery.** v. 3, n.4, p. 243-246, 2005.

FIGUEIRAS, A. R. R; COIMBRA, A. B.; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum.** v. 5, n. 2, p. 14-26, 2014.

GAO, W.; XU, K.; JI, L.; TANG, B. Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. **Toxicology Letters.** n. 205, p. 86-95, 2011.

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.

GOODMAN, C. M.; MCCUSKER, C. D.; YILMAZ, T.; ROTELLO, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjugate Chem.** v. 15, n. 4, p. 897-900, 2004.

HARRIS, C. D. **Análise Química Quantitativa: Fundamentos da Espectrofotometria.** 6ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 398-423.

HAUERT, S.; BHATIA, S. N. Mechanisms of cooperation in Cancer nanomedicine: Towards systems nanotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 32, n. 9, p. 448–455, 2014.

HE, Y. Q.; LIU, S. P.; KONG, L.; LIU, Z. F. A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering. **Spectrochimica Acta Part A**. n. 61, p. 2861–2866, 2005.

HEIDEN, M. G. V.; DEBERARDINIS, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. **Cell**. v.168, n. 4, p. 657-669, 2017.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTROM, J. H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** v. 42, p. 320-323, 2006.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A.; Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**. n. 1, p. 13-28, 2010.

KHAN, J. A.; PILLAI, B.; DAS, T. K.; YOGENDRA, S.; MAITI, S. Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in hela cells. **ChemBioChem**. v. 8, p. 1237-1240, 2007.

KULHARI, H.; POOJA, D.; SHRIVASTAVA, S.; NAIDU, V. G. M.; SISTLA, R. Peptide conjugated polymeric nanoparticles as a carrier for targeted delivery of docetaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. n. 117, p. 166–173, 2014.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 23 Jul. 2017.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Câncer**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 13 mar. 2017a.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Tipos de câncer: pele melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+>. Acesso em: 8 mar. 2017b.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Tipos de câncer: colo do útero**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio>. Acesso em: 8 Jul. 2017c.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Tipos de câncer: tratamento**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em: 8 mar. 2017d.

MAHMOOD, M.; CASCIANO, D. A.; MOCAN, T.; IANCU, C.; XU, Y.; MOCAN, L.; IANCU, D. T.; DERVISHI, E.; LI, Z.; ABDALMUHSEN, M.; BIRIS, A. R.; ALI, N.; HOWARD, P.; BIRIS, A. Cytotoxicity and biological effects of functional

nanomaterials delivered to various cell lines. **Journal of Applied Toxicology**. v. 30, n. 1, p. 74-83, 2009.

MAUREA, N.; COPPOLA, C.; RAGONE, G.; FRASCI, G.; BONELLI, A.; ROMANO, C.; LAFFAIOLI, R.V. Women survive breast cancer but fall victim to heart failure: the shadows and lights of targeted therapy. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)**. v. 11, n. 12, p. 861-868, 2010.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-15, 2013.

MANSOORI, A. G. Advances in Atomic & Molecular Nanotechnology. **Nanotechnology, United Nations Tech Monitor**. n. 1, p. 53-59, 2002.

MEHRNIA, S. S.; HASHEMI, B.; MOWLA, S. J.; ARBABI, A. Enhancing the effect of 4 MeV electron beam using gold nanoparticles in breast cancer cells. **Physica Medica**. n. 35, p. 18–24, 2017.

MICHAEL, H. T.; MERLINO, G. A Topical Solution to the Sunless Tanning Problem. **Trends Mol Med**. v. 23, n. 9, p. 771-773, 2017.

NCI – National Câncer Institute. **What is cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 13 Jul. 2017a.

NCI – National Câncer Institute. **Cancer Types: Skin Cancer (Including Melanoma) - Patient Version**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/skin>>. Acesso em: 13 Jul. 2017b.

NCI – National Câncer Institute. **Cancer Types: Cervical Cancer - Patient Version**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/cervical>>. Acesso em: 13 Jul. 2017c.

PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOËL, C. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements in vitro. **International Journal of Oncology**. n. 3, p. 473-476, 1993.

PATRA, H. K; BANERJEE, S.; CHAUDHURI, M. D.; LAHIRI, P.; DASGUPTA, A. K. Cell selective response to gold nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 3, p. 111–119, 2007.

PEREIRA, F. K. P.; FACCIO, M. T.; SANTO, J. A. M; ALMEIDA, C. L. A.; ARAÚJO, M. L. M; SILVA, R. O; ARAUJO, F. T. S. Construção de curva de calibração por padrão externo para determinação de teor de cobre em água potável da cidade Brejo do Cruz – Paraíba por Espectro fotometria de Absorção Molecular. In: CONGRESSO NORTE - NORDESTE DE QUÍMICA, 5, 2013, Natal. **Anais eletrônicos...** Natal: Universidade Federal de Rio Grande do Norte – UFPN, 2013. Disponível em: <<http://annq.org/eventos/upload/1361700670.pdf>>. Acesso em: 17 Jul. 2017.

QUADROS, C. C.; BRUNELLI, M. F.; FARIA, V. W.; SCHEEREN, C. W. Nanopartículas de au em líquido iônico suportadas em filmes biopoliméricos: uma

aula prática para investigação da atividade antimicrobiana. **Quim. Nova.** v. 39, n. 8, p. 1015-1018, 2016.

RAGHAVENDRA, R.; ARUNACHALAM, K.; ANNAMALAI, S. K.; ARUNACHALAM, A. M. Diagnostics and therapeutic application of gold nanoparticles. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** v. 6, n. 2, p. 74-87, 2014.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. S.; SENNA, S. G.; ROSSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** v. 30, n. 4, p. 455-460, 2004.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e cultura.** v. 60, n. 2, 2008.

SCHRAND, A. M.; RAHMAND, M. F.; HUSSAIN, S. M.; SCHLAGER, J. J.; SMITH, D. A.; SYED, A. F. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.** v. 2, n. 5, p. 544-568, 2010.

SHILO, M.; SHARON, A.; BARANES, K.; MOTIEI, M.; LELLOUCH, J-P. M.; POPVTZER, R. The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an in-vitro endothelial cell model. **Journal of Nanobiotechnology.** v. 13, n. 19, p. 1-7, 2015.

SHRIKHANDE, S. S.; JAIN, D. S.; ATHAWALE, R. B.; BAJAJ, A. N.; GOEL, P.; KAMRAN, Z.; NIKAM, Y.; GUDE, R. Evaluation of anti-metastatic potential of Cisplatin polymeric nanocarriers on B16F10 melanoma cells. **Saudi Pharmaceutical Journal.** n. 23, p. 341-351, 2015.

TOMA, H. E.; BONIFÁCIO, L. S. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. **Quim. Nova.** v. 28, n. 5, p. 897-900, 2005.

VIAL, S.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine. **Current Opinion in Solid State and Materials Science.** n. 21, p. 92–112, 2017.

VILLIERS, C. L.; FREITAS, H.; COUDERC, R. Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: effect on dendritic cell functions. **J Nanopart Res.** v. 12, p. 55-60, 2010.

WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to câncer. **Pharmacological Research.** v. 62, p. 90–99, 2010.

WANG, J.; BYRNE, J. D.; NAPIER, M. E.; DESIMONE, J. M. More Effective Nanomedicines through Particle Design. **Small.** v. 7, n. 14, p. 1919-1931, 2011.

WHO – World Health Organization. **Cancer.** Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 26 Jul. 2017.

XU, X.; STEVENS, M.; CORTIE, M. B. In Situ Precipitation of Gold Nanoparticles onto Glass for Potential Architectural Applications. **Chem. Mater.** v. 16, n. 11, p. 2259-2266, 2004.

ZHU, T.; VASILEV, K.; KREITER, M.; MITTLER, S.; KNOLL, W. Surface Modification of Citrate-Reduced Colloidal Gold Nanoparticles with 2-Mercaptosuccinic Acid. **Langmuir.** v. 19, n. 22, p. 9518-9525, 2003.