

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BARBARA JUSTUS

SÍNTESE VERDE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO FUNCIONALIZADAS PARA O POTENCIAL
TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

PONTA GROSSA
2020

BARBARA JUSTUS

SÍNTESE VERDE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO FUNCIONALIZADAS PARA O POTENCIAL
TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Tese apresentada para a obtenção do título de doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula

PONTA GROSSA
2020

J96 Justus, Barbara

Síntese verde, caracterização e avaliação citotóxica de nanopartículas de prata e de ouro funcionalizadas para o potencial tratamento da leucemia mieloide crônica / Barbara Justus. Ponta Grossa, 2020.

73 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula.

1. Síntese verde. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Citotoxicidade. 4. Leucemia mieloide crônica. 5. Fibroblastos. I. Paula, Josiane de Fátima Padilha de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

Ponta Grossa, 13 de março de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2020 DA DOUTORANDA BARBARA JUSTUS REALIZADA NO DIA 13 DE MARÇO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos treze dias de março de dois mil e vinte, às 14:00h00min, no auditório do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala 115- Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane Fátima Padilha de Paula reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Barbara Justus, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pela Professora Doutora Josiane Fátima Padilha de Paula (UEPG/PR), e demais Doutores (membros titulares): Patricia Mathias Doll Boscardin (UEPG/PR), Paulo Vitor Farago (UEPG/PR), Vanessa Godoy Jasisnski (CESCAGE) e Daniella Gaspardo Folquitto (CESCAGE/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“SÍNTESE VERDE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO PARA O POTENCIAL TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA”**.

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se PELA APROVAÇÃO da tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

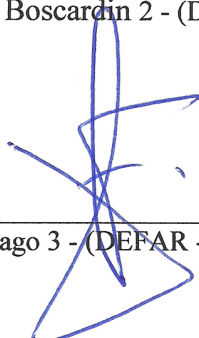
Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

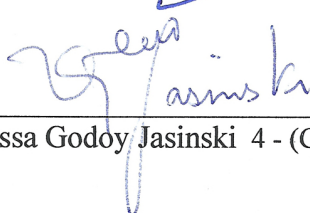

Josiane Fátima Padilha de Paula - (DEFAR - UEPG) Presidente



Patricia Mathias Doll Boscardin 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular



Paulo Vitor Farago 3 - (DEFAR - UEPG) – Titular



Vanessa Godoy Jasinski 4 - (CESCAGE) – Titular



Daniella Gaspar do Folquitto 5 - (CESCAGE) – Titular

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nunca me deixou só. Sempre estive ao meu lado quando os dias se tornavam difíceis e sempre iluminava o caminho por onde eu iria passar.

Aos meus familiares, minha mãe Joseli, meu pai Christiano, minha tia Josiane, minha irmã Helena e meu sobrinho Bernardo, que sempre foram meu alicerce, me dando forças para continuar.

Ao meu noivo Andrés, que estive ao meu lado e me ajudou nos dias de muito trabalho.

À professora Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula, que sempre me acompanha desde que nasci até os dias de hoje, em minha caminhada pessoal, acadêmica e profissional, proporcionando-me grandes oportunidades.

À professora Dr^a. Carla Cristine Kanunfre, que me ensinou e me auxiliou nos trabalhos com as linhagens celulares.

Ao professor Dr. Paulo Vitor Farago, à professora Dr^a. Jane Manfron Budel, à professora Dr^a. Patrícia Mathias Döll Boscardin, que sempre me ajudaram e deram suporte às publicações.

A professora Dr^a. Karen Wohnrath e o professor Dr. Jarem Raul Garcia, pelo auxílio nas interpretações das análises de FTIR e de difração de raios X.

Ao laboratório Lapac, por permitir a realização de algumas análises em sua estrutura e por sempre apoiar a pesquisa.

RESUMO

As nanopartículas metálicas podem ser produzidas por meio da redução com produtos naturais, a chamada síntese verde. Essas nanopartículas podem ser utilizadas para a entrega vetorizada de fármacos, aumentando a atividade e reduzindo os efeitos colaterais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas metálicas de prata e de ouro, produzidas a partir do extrato aquoso de *Lavandula dentata* L., funcionalizadas com metotrexato, estabilizadas ou vetorizadas, e avaliar o seu potencial citotóxico em linhagem de células de leucemia mieloide crônica (K562), bem como sua citotoxicidade em linhagem de fibroblastos (3T3). A caracterização das nanopartículas foi realizada por métodos espectroscópicos e morfológicos como UV-Vis, AFM, MET, difração de raios X, FTIR e análise do diâmetro médio por dispersão dinâmica da luz. Para a avaliação da citotoxicidade em células K562 foi realizado o ensaio de redução do MTT, liberação da enzima LDH, avaliação do ciclo celular, despolarização da membrana mitocondrial por citometria de fluxo e a morfologia foi observada por meio de microscopia de fluorescência. Para as células 3T3, foi realizado o ensaio de redução do MTT e liberação do LDH. O extrato aquoso de *L. dentata* se mostrou um produto natural adequado para a síntese verde das nanopartículas metálicas. Todas as nanopartículas metálicas, de prata e de ouro, foram obtidas com sucesso e apresentaram formato esférico, tamanho reduzido e características uniformes. As nanopartículas metálicas obtidas foram altamente efetivas na redução da viabilidade celular. Também foi possível concluir que as nanopartículas metálicas em estudo conduzem as células a um processo de morte celular por apoptose. As nanopartículas vetorizadas com biotina mostraram a melhor performance como agente citotóxico uma vez que reduziu a viabilidade celular das células tumorais sem apresentar efeito sobre as células normais com um índice de seletividade de 2,8. Estes resultados podem subsidiar o uso futuro dos nanosistemas vetorizados no tratamento anticâncer.

Palavras-chave: Síntese verde. Nanopartículas metálicas. Citotoxicidade. Leucemia mieloide crônica. Fibroblastos.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles can be obtained by reduction using natural products which is known as green synthesis. These nanoparticles can be used for drug delivery with an increased activity and reduced side effects. The aim of this study was developed and to characterize stable and target nanoparticles of silver and gold associated with metotrexate and produced using the aqueous extract of *Lavandula dentata* L. Their cytotoxic potential in a chronic myelogenous leukemia cell line (K562) by MTT reduction, LDH enzyme release, cell cycle evaluation, mitochondrial membrane depolarization, evaluation of morphology by fluorescence microscopy was investigated. As well as the cytotoxicity on fibroblast (3T3) cell line by MTT reduction and LDH release. The characterization of nanoparticles was performed by spectroscopic and morphological methods such as UV-Vis, AFM, TEM, X-ray diffraction, FTIR and analysis of the diameter by dynamic light scattering. The aqueous extract of *L. dentata* proved to be suitable for the green synthesis of metal nanoparticles. All metal nanoparticles containing silver or gold were successfully obtained and presented spherical shape, low size and uniform characteristics. The obtained nanoparticles were remarkable effective in reducing cell viability. We can conclude that metal nanoparticles led to a cell death by apoptosis. Biotin-targeted gold nanoparticles showed the best performance as cytotoxic agent because provided the reduction of leukemic cells with no effect on normal cells with a selectivity index of 2,8. These results can subsidize a future use of target nanosystems for further anticancer drug therapy.

Key-words: Green synthesis. Metallic nanoparticles. Cytotoxicity. Chronic myelogenous leukemia. Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Formação de nanopartículas por meio da redução química, método “ <i>bottom-up</i> ”.....	18
Figura 2	-	Estrutura química do metotrexato.....	24
Figura 3	-	Espectros de UV-Vis das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), das nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) nos diferentes períodos de tempo (dias).....	34
Figura 4	-	Espectros de UV-Vis das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs), das nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e nanopartículas de ouro com biotina (Ld Au MTX B NPs) nos diferentes períodos de tempo (dias).	36
Figura 5	-	Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (A) e ouro (Ld Au NPs) (B), nanopartículas de prata com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (C) e ouro com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (D), de prata com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (E) e ouro com biotina (Ld Au MTX B NPs) (F).	41
Figura 6	-	Imagens de microscopia de transmissão das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (A) e ouro (Ld Au NPs) (B), nanopartículas de prata com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (C) e ouro com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (D), de prata com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (E) e ouro com biotina (Ld Au MTX B NPs) (F).	43
Figura 7	-	Difratogramas de raios X das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (A), das nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (B) e das nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (C).....	46

Figura 8	-	Difratogramas de raios X das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs) (A), das nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (B) e das nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) (C).....	47
Figura 9	-	Espectros de FTIR da nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), das nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e das nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs).....	49
Figura 10	-	Espectros de FTIR das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs), das nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e das nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs).....	49
Figura 11	-	Viabilidade celular (%) de células K562 frente aos diferentes tratamentos.....	52
Figura 12	-	Porcentagem de liberação da enzima lactato desidrogenase em células K562 após 24 horas de tratamento.....	54
Figura 13	-	Efeito das nanopartículas desenvolvidas com extrato aquoso de <i>Lavandula dentata</i> L. sobre a morfologia das células K562 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.....	59
Figura 14	-	Viabilidade celular (%) de células 3T3 frente aos diferentes tratamentos.....	61
Figura 15	-	Porcentagem de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células 3T3 após 24 horas de tratamento.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas de prata e das nanopartículas de ouro.....	38
Tabela 2	-	Resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro após 150 dias armazenado ao abrigo da luz e sob refrigeração 4-8°C.	39
Tabela 3	-	Diâmetro médio das nanopartículas, desenvolvidas com extrato aquoso de <i>L. dentata</i> , obtido por meio das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.	42
Tabela 4	-	Valores obtidos para o tamanho de partícula por meio da equação de Scherrer.	48
Tabela 5	-	Distribuição celular nas diferentes fases do ciclo na linhagem K562.	56
Tabela 6	-	Porcentagem de polarização e despolarização mitocondrial após 24 horas de tratamento com a linhagem K562.	57

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	- Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.	29
Equação 2	- Cálculo da atividade de LDH (U/L) a partir da variação da absorbância (ΔA) a cada minuto.	30
Equação 3	- Cálculo do índice de seletividade.	32
Equação 4	- Equação de Debye-Scherrer para a obtenção do diâmetro de partícula.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV-Vis	Ultravioleta-visível
AFM	Microscopia de força atômica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
LDH	Lactato desidrogenase
LMC	Leucemia mieloide crônica
PVAL	Poli(álcool vinílico)
MTX	Metotrexato
DHFR	Diidrofolato redutase
PDI	Índice de polidispersão
N/m	Newton por metro
kV	Kilovolts
°	Graus
°C	Graus Celsius
mA	Miliampere
kHz	Kilohertz
µm	Micrômetro
Å	Ångström
α	Alpha
λ	Comprimento de onda
®	Marca registrada
mM	Milimolar
%	Por cento
mg/L	Miligramas por litro
DMSO	Dimetilsulfóxido
mL	Mililitro
µm	Microlitro
µ	Micro
U/L	Unidades por litro
Rpm	Revoluções por minuto
nm	Nanômetros
±	Mais ou menos
<	Menor que
mV	Milivolt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 NANOTECNOLOGIA	15
2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO	16
2.3 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	17
2.4 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NA TERAPIA DO CÂNCER	20
2.5 METOTREXATO NO TRATAMENTO DO CÂNCER	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>LAVANDULA DENTATA</i> L. – LAMIACEAE	26
4.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	26
4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	26
4.4 ASSOCIAÇÃO COM METOTREXATO E ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)	27
4.5 ASSOCIAÇÃO COM METOTREXATO E VETORIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM BIOTINA	27
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	27
4.6.1 Análise por espectroscopia UV-Visível	27
4.6.2 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta	27
4.6.3 Microscopia de força atômica	27
4.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão	28
4.6.5 Análise de difração de raios X	28
4.6.6 Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	28
4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO EM CÉLULAS K562	28
4.7.1 Ensaio do metabolismo celular por redução do MTT em células K562	29
4.7.2 Ensaio da integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células K562	29
4.7.3 Análise do ciclo celular em células K562	30

4.7.4	Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria em células K562	30
4.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS 3T3	32
4.8.1	Ensaio do metabolismo celular por redução do MTT em células 3T3.....	32
4.8.2	Ensaio da integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células 3T3	33
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	34
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	37
5.2.1	Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta	37
5.2.2	Microscopia de força atômica	39
5.2.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	42
5.3.4	Análise por difração de raios X	44
5.3.5	Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	48
5.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO EM CÉLULAS K562	51
5.4.1	Ensaio de metabolismo celular por redução do MTT em células K562	51
5.4.2	Ensaio de integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células K562.....	53
5.4.3	Análise do ciclo celular em células K562.....	54
5.4.4	Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria em células K562	56
5.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS 3T3	60
5.5.1	Ensaio de metabolismo celular por redução do MTT em células 3T3.....	60
5.5.2	Ensaio de integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células 3T3	62
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia apresenta rápido crescimento, com diversas aplicações na ciência e na tecnologia. Muitos métodos estão disponíveis para a produção de nanomateriais metálicos, empregando microrganismos, principalmente bactérias e fungos, e produtos naturais como doadores de elétrons para a redução de diversos metais entre os quais a prata, o zinco, o cobre e o ouro. Os produtos naturais se mostram alternativas de baixo custo, apresentam característica doadora de elétrons para redução do metal e apresentam potencial de ampliação da escala para a produção a nível industrial.

Dentre as propriedades atribuídas às nanopartículas metálicas, destacam-se a atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras. Entretanto, estudos recentes mostram que avaliar a citotoxicidade das nanopartículas frente às células normais também é uma importante etapa, visando um tratamento mais específico para as células tumorais.

As pesquisas atuais nessa área estão voltadas para o desenvolvimento de nanopartículas vetorizadas, levando o fármaco diretamente ao sítio de ação, aumentando assim a atividade e, conseqüentemente, reduzindo os efeitos adversos.

Nesse panorama, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas metálicas de prata e de ouro conjugadas com metotrexato, bem como, estabilizar, funcionalizar e avaliar o seu potencial citotóxico em linhagem de leucemia mieloide crônica (K562) e de fibroblastos (3T3), conforme toda base conceitual da literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NANOTECNOLOGIA

As partículas em escala nanométrica não são novidade, nem na natureza, nem para a ciência. Entretanto, os recentes avanços em diversas áreas têm dado aos cientistas novas ferramentas para a compreensão do fenômeno que ocorre naturalmente, quando um material é organizado em escala nanométrica. Uma partícula criada com dimensões entre 1-100 nm tem suas propriedades alteradas significativamente quando comparada ao mesmo material em escala maior, principalmente, a expansão da sua área superficial (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006).

O produto obtido na escala nanométrica tem uma área de superfície muito maior do que em escala normal e esse aumento o torna muito mais reativo. Em alguns casos, o material inerte, quando reduzido, pode ter sua força e propriedades elétricas modificadas. Além disso, os efeitos quânticos começam a dominar o comportamento da matéria nesse tamanho, afetando o comportamento óptico, elétrico e magnético deste material (MARTINS; TRINDADE, 2012).

A nanotecnologia visa o desenvolvimento, a caracterização, a produção e as aplicações de sistemas e componentes em nanoescala (KHAN *et al.*, 2014; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). Esta área também se beneficia da multidisciplinariedade para buscar inovações para a solução de problemas, unindo diferentes áreas da ciência (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

As aplicações atuais dos materiais obtidos por nanotecnologia incluem componente eletrônicos, indústrias de alimentos e cosméticos, tratamento de água, além do grande potencial na área médica, tanto como agentes antimicrobianos em próteses, cateteres, materiais odontológicos, como agentes quimioterápicos e para vetorização de medicamentos. Esses nanomateriais podem ser produzidos em uma dimensão, como revestimentos muito finos; em duas dimensões, como nanotubos; ou, em três dimensões, como, por exemplo, as nanopartículas. (KHAN *et al.*, 2014; ANTUNES *et al.*, 2013; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

As nanopartículas apareceram, pela primeira vez, em Roma, no século IV a.C. com o Cálice de Licurgo, elaborado com nanopartículas de prata e de ouro, com

tamanhos menores que 70 nm. Estas nanopartículas, presentes no cálice, apresentavam uma cor esverdeada quando visualizado por reflexão e avermelhada quando observada por transmissão (JUNIOR *et al.*, 2012). Michael Faraday, em 1857, relacionou o tamanho das nanopartículas de ouro e sua coloração, sendo que com um tamanho reduzido a nanômetros, as nanopartículas apresentam características distintas, como energia de transição eletrônica, podendo mudar a cor dependendo da densidade dos estados eletrônicos, do tamanho e do formato das mesmas. Em 1908, Gustav Mie relatou que a alteração da cor é resultante da oscilação coletiva dos elétrons no nanomaterial (HAISS *et al.*, 2007).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO

As nanopartículas de prata surgiram aproximadamente em 1910 e foram empregadas em queimaduras, distúrbios nervosos e na sífilis (ANTUNES *et al.*, 2013; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

Atualmente, as nanopartículas também são utilizadas em baterias elétricas, receptores ópticos, como catalisadores em reações químicas, sistemas de vetorização de fármacos e antimicrobianos (KHAN *et al.*, 2014; PHILIP, 2009).

O seu potencial antimicrobiano contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus, pode ser atribuído ao seu tamanho, que permite um maior contato com o microrganismo e favorece a passagem pela membrana e alcance ao interior da célula. A prata interage com enxofre e fósforo, elementos presentes na membrana celular, com os quais tem grande afinidade. Essa interação leva a danos no processo de respiração celular, perturbação na permeabilidade da membrana e danos ao DNA, impedindo a divisão celular (ANTUNES *et al.*, 2013; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

Dessa forma, as nanopartículas metálicas surgem como potenciais agentes antitumorais provocando danos no DNA, parada de ciclo celular, estresse oxidativo e outros efeitos, levando assim, a um processo de morte por apoptose, necrose ou ambos (MUHAMMAD *et al.*, 2016).

Além das nanopartículas de prata, outros metais já foram estudados para a sua produção como cobre, cádmio, ouro, cobre, zinco, ferro, manganês, porém as soluções coloidais de prata e ouro são as mais interessantes devido a facilidade de preparo e de modificação química (JUNIOR *et al.*, 2012).

As nanopartículas de ouro apresentam vantagens sobre as outras nanopartículas metálicas, por serem atóxicas, apresentarem tamanho controlável, alta estabilidade e biocompatibilidade, forte capacidade de absorção e uma grande área superficial, prontamente disponível para interação com moléculas vetorizadoras ou biomarcadores específicos que podem ser aplicados na área da biomedicina (KUMAR *et al.*, 2016; JEYARAJ *et al.*, 2014).

A ampla compatibilidade com organismo e capacidade de conjugação com outros agentes, deve-se ao formato e ao tamanho das nanopartículas de ouro. Além disso, mostraram-se excelentes agentes terapêuticos, podendo carrear uma grande quantidade de fármaco até o alvo (KHAN *et al.*, 2014).

O ouro na sua forma coloidal, apresenta coloração avermelhada e é utilizado há mais de mil anos. Durante as últimas décadas, o ouro vem sendo aplicado na área de diagnóstico, terapêutica, em catálises, como biomarcador e carreador de fármacos devido a sua alta estabilidade (KHAN *et al.*, 2014; HAISS *et al.*, 2007).

Suas propriedades ópticas variam de acordo com seu tamanho e sua forma. Quando o tamanho da partícula está entre 2 e 10 nm, apresenta tons avermelhados, passando a expressar cor violeta quando as partículas se encontram com tamanhos maiores, isto se deve às mudanças na ressonância plasmônica da superfície das partículas, como por exemplo, sofrer uma oscilação quando submetida à radiação eletromagnética (HAISS *et al.*, 2007).

Entretanto, a obtenção das nanopartículas metálicas demandam alto investimento e, por isso, faz-se necessário o estudo e aperfeiçoamento dos métodos utilizados para garantir custo reduzido e alta performance (ANTUNES *et al.*, 2013).

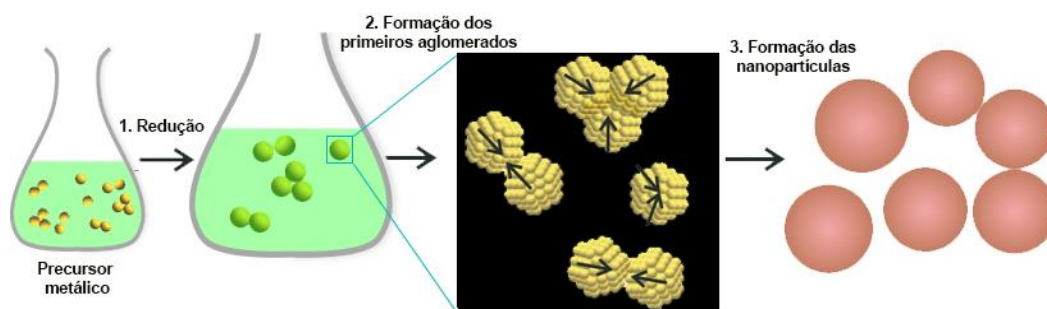
2.3 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas podem ser produzidas por meio de métodos físicos do tipo “*top-down*”, no qual um material maior subdivide em pequenas unidades, e por métodos químicos, do tipo “*bottom-up*”, nos quais se gera uma agregação controlada de átomos em partículas (Figura 1). Os métodos químicos são os mais utilizados por produzirem partículas mais uniformes e de tamanho extremamente reduzido (IQBAL; PREECE; MENDES, 2012).

Com essa finalidade, comumente são utilizados os sais metálicos, que são colocados em contato com um agente redutor (POLTE, 2015). A reação de redução

gera átomos do metal que são aglomerados em oligômeros. Esta aglomeração leva a absorção em comprimentos de onda específicos, devido à excitação coletiva dos elétrons (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Figura 1 - Formação de nanopartículas por meio da redução química, método “bottom-up”.



Fonte: Adaptado de POLTE (2015).

Como agentes redutores, podem ser utilizados álcoois, carboidratos, ácido ascórbico, citrato de sódio, borohidreto de sódio, formaldeídos, hidrazinas, entre outros. Esta redução se dá pela característica dessas substâncias em doar elétrons aos cátions do metal. A substância redutora é um dos fatores que determinam o tamanho da partícula, assim como, a velocidade, o tempo de agitação e de gotejamento (KHAN *et al.*, 2014).

A maioria dos métodos que produzem nanopartículas metálicas de tamanho reduzido envolvem substâncias químicas e agentes de revestimento que agregam alta toxicidade para a aplicação biológica (DURGADAS *et al.*, 2012). Sendo assim, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos ecologicamente corretos e sustentáveis, que permitam a produção de materiais e produtos atóxicos em processos ambientalmente benignos. Por isso, alternativamente, pode-se utilizar agentes de origem natural para a síntese das nanopartículas metálicas. Este método tem sido amplamente empregado e é conhecido como síntese verde (KUMAR *et al.*, 2016; PHILIP, 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

A síntese verde é a transformação de íons metálicos inorgânicos em nanopartículas metálicas quando colocados em sistemas biológicos com bactérias, fungos, leveduras ou plantas. Os extratos vegetais, por exemplo, podem ser utilizados tanto como agente redutor, como agente de revestimento e de estabilização, são ambientalmente seguros e quimicamente complexos, por conter

substâncias bioativas como enzimas, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos e vitaminas. Paralelamente, essas biomoléculas utilizadas como agentes redutores apresentam vantagens expressivas, pois atuam como agentes protetores de complexação das nanopartículas (PHILIP, 2009; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

A espécie *Lavandula dentata* L. foi selecionada para a produção das nanopartículas metálicas propostas neste trabalho, tendo em vista que muitas espécies deste gênero produzem moléculas bioativas, como os compostos fenólicos. Esses metabólitos conferem à planta propriedades antimicrobianas, anticolinesterases e antioxidantes, garantindo proteção contra o estresse oxidativo (COSTA *et al.*, 2013; ZUZARTE *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos são uma grande classe de metabólitos secundários que têm como base um grupo hidroxila ligado diretamente a um grupo aromático, podendo ser classificados como fenóis simples ou polifenóis (DIAS; DAVID; DAVID, 2016).

Os flavonoides são um dos grupos mais abundantes dentro dos compostos fenólicos e encontram-se principalmente acumulados na epiderme de folhas e no epicarpo de frutos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Estes compostos têm alta capacidade de captar espécies reativas de oxigênio, apresentando, dessa forma, importante ação antioxidante (PORT'S *et al.*, 2013). A presença destes compostos que garantem as várias atividades farmacoterapêuticas atribuídas ao vegetal, também determinam o seu potencial como agente redutor na produção das nanopartículas metálicas (DEVATHA; THALLA, 2018).

Para a síntese verde, deve-se seguir três etapas: primeira, a seleção do meio solvente; segunda, a seleção do agente redutor ambientalmente seguro; e, terceira, a seleção de substâncias não-tóxicas para a estabilização (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Um dos grandes desafios no desenvolvimento das nanopartículas de metais nobres é a sua estabilização. As reações de redução em solução levam a formação de dispersões coloidais de nanopartículas instáveis, o que pode promover aglomeração, alteração no tamanho, na forma e na estrutura cristalina das nanoestruturas .

Para a estabilização das nanopartículas podem ser utilizados polímeros, que promovem uma estabilização estérica uma vez que são moléculas de cadeia longa, como poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVAL) e poli(ácido acrílico) (PAA) que têm alta afinidade pelas nanopartículas, aumentando a distância entre as partículas e fazendo com que a entropia do sistema diminua (POLTE, 2015; ANTUNES *et al.*, 2013; JUNIOR *et al.*, 2012).

O poli(álcool vinílico), comumente utilizado como estabilizador, é um biopolímero hidrossolúvel que apresenta uma citotoxicidade extremamente baixa (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). Além disso, este agente de recobrimento pode proteger do reconhecimento e ativação do sistema imune, uma vez que as nanopartículas metálicas podem levar a efeitos adversos como estresse oxidativo, inflamação, resposta imunológica, identificação e remoção do corpo estranho por macrófagos (KONG *et al.*, 2011). Assim, o revestimento possibilita um aumento no tempo em que as nanopartículas metálicas permanecem atuando no organismo.

2.4 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NA TERAPIA DO CÂNCER

As características e as propriedades distintas dos metais geram inúmeras alternativas para a medicina (KUMAR *et al.*, 2016). As nanopartículas podem ser utilizadas para transportar os fármacos pelo organismo, para a entrega vetorizada de fármacos, para aumentar a solubilidade, para limitar a imunotoxicidade dos fármacos, armazenando-os em vesículas fechadas até o sítio alvo, entre outras (KONG *et al.*, 2011).

A utilização de nanopartículas metálicas no campo da medicina promoveu um avanço no tratamento do câncer, permitindo a vetorização de fármacos e provando ser uma excelente alternativa para o direcionamento do fármaco diretamente para os tumores. Além disso, proporciona uma maior permeabilidade e retenção dos fármacos no sítio de ação, o que é uma característica singular das nanopartículas metálicas, fazendo com que os fármacos tenham uma maior interação com a célula tumoral (KHAN *et al.*, 2014).

Para que as nanopartículas metálicas apresentem um potencial carreador do fármaco, elas devem ser funcionalizadas, permitindo a conjugação com o fármaco, promovendo uma otimização de suas propriedades. As nanopartículas são

excelentes carreadores, pois apresentam o tamanho ideal para a entrega dos fármacos, aumentam a permeabilidade devido ao tamanho e o formato esférico pode estar relacionado com um alto efeito antitumoral (TRAN *et al.*, 2013).

Na terapêutica convencional, o câncer é tratado por meio de sessões de quimioterapias e de radioterapias. Essas abordagens terapêuticas são tratamentos tóxicos e não específicos, apresentam vários efeitos adversos com alto índice de mortalidade (CHEN *et al.*, 2010).

Além disso, o paciente pode apresentar resistência a alguns fármacos, queda de cabelo, fadiga, náusea, vômitos, diarreia, problemas oculares, *rash* cutâneo, problemas urinários relacionados ao tratamento com os quimioterápicos, uma vez que a estratégia terapêutica não é específica e atinge indistintamente células tumorais e células normais (CONKLIN, 2000).

Com essa ação descontrolada, não específica, os agentes quimioterápicos também podem levar à nefrotoxicidade, vômitos, mielossupressão, náuseas, estomatites, alopecia e distúrbios gastrointestinais. Com isso, um grande número de mortes está relacionado com a agressividade, falta de seletividade, resistência e ineficácia do tratamento. Assim, a vetorização de fármacos é uma tecnologia inovadora que permite minimizar os efeitos adversos, aumentar a seletividade e eficácia dos medicamentos (KHAN *et al.*, 2014).

Estudos têm buscado definir também a toxicidade dos produtos em escala nanométrica, uma vez que quanto menor o tamanho, maior o contato com as células e facilidade na passagem pela membrana. Por isso, é importante saber como ocorre a captação da nanopartícula pelas células, sua biodistribuição e se seus efeitos citotóxicos estão ligados a danos ao DNA, necrose ou apoptose, assim como seus efeitos adversos em células normais, ativação do sistema imune, entre outros efeitos (JIA *et al.*, 2017; JEYARAJ *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2011).

As células tumorais expressam muitos receptores de membrana específicos para anticorpos monoclonais, ácidos graxos poli-insaturados, ácido fólico, aptâmeros, transferrina, oligopeptídeos, ácido hialurônico, açúcares, fatores de crescimento, entre outros, que estão sendo recomendados como sítio alvo para a vetorização de fármacos (CHEN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2009). Alguns destes receptores apresentam alto custo e alta complexidade, grande tamanho e alto

potencial para a ativação do sistema imune, por isso, o melhor direcionamento se dá com moléculas pequenas, como por exemplo, as vitaminas, que são excelentes agentes vetorizadores (CHEN *et al.*, 2010).

A superexpressão de alguns receptores na superfície das células se dá pela rápida proliferação celular das linhagens tumorais e maior demanda de diversas substâncias. Sendo assim, elas se tornam biomarcadores para o direcionamento das formulações vetorizadas e abre-se uma nova abordagem para uso destas substâncias, que em conjunto a diferentes carreadores funcionalizados possibilitam a vetorização de fármacos (CHEN *et al.*, 2010).

Sabe-se que todas as células vivas precisam de vitaminas para o metabolismo e a sobrevivência das mesmas, entretanto as células cancerosas apresentam divisão celular muito rápida e exigem maiores concentrações dessas substâncias. Assim sendo, as células superexpressam os receptores dessas vitaminas na superfície das células cancerígenas tornando os mesmos biomarcadores e podem atuar como agentes ligantes na vetorização para administração de medicamentos. A biotina (vitamina B7) é uma destas vitaminas e apresenta grande potencial para vetorização, visto que trabalhos já demonstram sua biocompatibilidade em nanopartículas e seu alto potencial de vetorização (CHEN *et al.*, 2010; CONNOR *et al.*, 2005).

2.5 METOTREXATO NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Nos próximos anos, até 2030, o câncer atingirá grande parte da população e causará a morte de 12 milhões de pessoas, segundo a Organização Mundial da Saúde. Um estudo publicado em 2020, estima o número de novos casos e de mortes para este ano. Serão 1.806.590 novos casos com 606.520 mortes, para ambos os sexos e todos os tipos de câncer, somente nos Estados Unidos. Nesse sentido, há uma necessidade de novos investimentos e inovações, seja para o desenvolvimento de novas terapias ou para aprimorar os tratamentos já existentes (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

O câncer se desenvolve em qualquer idade, ele ocorre de uma proliferação celular desregulada ou da incapacidade de sofrer uma morte celular programada, chamada apoptose. Devido às projeções pouco otimistas, ao aumento da mortalidade por câncer e às limitações envolvendo os fármacos disponíveis, os

pesquisadores têm se empenhado no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos, como as nanopartículas metálicas modificadas para o tratamento e controle destas condições (MURAWALA *et al.*, 2014).

A quimioterapia, em teoria, tem sua ação direcionada para células tumorais, pois age nas células que estão ativamente se dividindo e proliferando rapidamente, o que não é o caso das células normais. A substância quimioterápica bloqueia o ciclo de reprodução celular e deveria apresentar um efeito mais severo nas células cancerígenas do que nas normais, porém, isso não ocorre (CONKLIN, 2000).

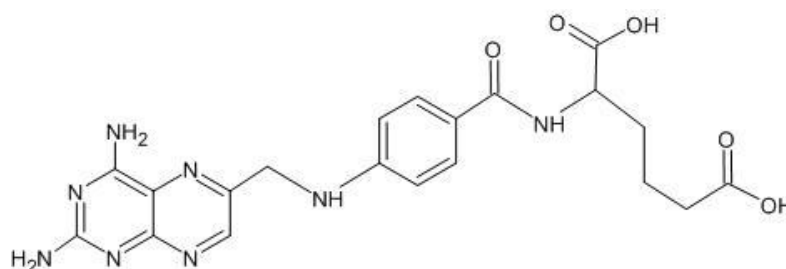
O metotrexato (MTX) (Figura 2) é um fármaco utilizado como quimioterápico no tratamento de algumas formas de câncer, principalmente leucemias e linfomas. Ele é um antagonista do folato, inibe a ativação da diidrofolato redutase (DHFR) e da timidilato sintetase, não ocorrendo a formação do tetrahidrofolato e da timidina, que são necessários para a síntese de DNA e para a proliferação celular. A absorção do MTX leva à morte celular por apoptose, conduzindo a uma parada no ciclo celular na fase S, pela ligação irreversível com as enzimas já citadas (DURGADAS *et al.*, 2012; HOLMBOE *et al.*, 2011; YAMAUCHI *et al.*, 2005).

A dose e a duração do tratamento são limitadas devido à alta toxicidade, que é dose dependente. Apresenta perfil de resistência dada a bomba de efluxo de fármaco e limitada capacidade de atravessar as barreiras biológicas. Por isso, sugere-se a incorporação desse fármaco a novos sistemas de liberação, como micropartículas, nanopartículas, lipossomas, entre outros (MUHAMMAD *et al.*, 2016; YAMAUCHI *et al.*, 2005).

Altas doses de MTX são necessárias para uma atividade anticâncer eficiente, uma vez que a meia-vida desse fármaco é baixa, aproximadamente 8 horas (MUHAMMAD *et al.*, 2016; BERTINO *et al.*, 1996). Em baixas doses, o MTX pode apresentar propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras devida à capacidade do fármaco de inibir também a proliferação de linfócitos e outras células, como neutrófilos polimorfonucleares (GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003).

Alguns trabalhos descrevem que ao associar o fármaco com nanopartículas pequenas é possível aumentar o tempo de meia-vida e também aumentar a entrada do fármaco nas células tumorais (WOSIKOWSKI *et al.*, 2003; RUBINO, 2001).

Figura 2 - Estrutura química do metotrexato.



Fonte: A autora.

O MTX pode ser administrado tanto por via oral, em dose única semanal de 10-25 mg ou 2,5 mg de 12/12 horas três vezes por semana. Por via parenteral, em dose única semanal de 10 a 25 mg via endovenosa ou intramuscular. Assim que a concentração terapêutica é atingida, deve-se reduzir a dose pelos efeitos adversos que podem ocorrer como hepatotoxicidade, depressão da medula óssea, leucopenia, trombocitopenia, anemia, estomatite ulcerativa, náuseas, distensão abdominal, entre outros (MUHAMMAD *et al.*, 2016; DOOREN-GREEBE *et al.*, 1994).

Devido a sua alta polaridade, quando em pH neutro nos fluidos biológicos apresenta-se, principalmente, na sua forma aniônica e tem dificuldade de atravessar a membrana celular e necessita de um sistema de transporte específico para conseguir entrar nas células, por isso a necessidade de desenvolver sistemas que otimizem as propriedades deste fármaco (RUBINO, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro obtidas por síntese verde funcionalizadas com metotrexato, bem como, estabilizar, vetorizar e avaliar o seu potencial citotóxico em linhagem de leucemia mieloide crônica (K562) e de fibroblastos (3T3).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, determinar o material botânico e obter o extrato aquoso de *Lavandula dentata* L.;
- Sintetizar as nanopartículas de prata e as nanopartículas de ouro por meio do extrato aquoso de *Lavandula dentata* L.;
- Promover a funcionalização das nanopartículas de prata e das nanopartículas de ouro ao metotrexato;
- Estabilizar com poli(álcool vinílico) e vetorizar com biotina as nanopartículas produzidas;
- Efetuar a caracterização morfológica e espectroscópica das nanopartículas desenvolvidas;
- Avaliar a citotoxicidade em células K562 e 3T3 por meio do ensaio de redução do MTT e liberação de LDH;
- Realizar a análise do ciclo celular, despolarização de membrana e microscopia de fluorescência para elucidar o mecanismo de citotoxicidade em células K562.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *LAVANDULA DENTATA* L. – LAMIACEAE

Foram coletadas as partes vegetativas aéreas de *Lavandula dentata* L. durante o verão, no Horto Medicinal do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa – Campus Uvaranas (25°5'23"S 50°6'23"W) em Ponta Grossa, Paraná – Brasil. Os exemplares foram submetidos à confecção de exsicatas, determinado por taxonomista e estão registrados no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM) sob o número 390597.

O material vegetal foi lavado cuidadosamente com água destilada para a remoção de todas as partículas visíveis e indesejáveis. Depois disso, foi pesada uma quantidade pré-determinada do vegetal fresco fracionado em um béquer, adicionado 1000 mL de água destilada e submetido ao aquecimento. Foram contados 60 minutos após ebulição e, depois, reservado até atingir a temperatura ambiente. Após isso, filtrou-se através de um filtro com 0,22 µm de poro e o extrato aquoso resultante foi armazenado a 4-8°C e ao abrigo da luz durante 150 dias.

4.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para a síntese das nanopartículas de prata, pelo método “*bottom-up*”, foi preparada uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) e uma quantidade pré-definida do extrato aquoso de *L. dentata* foi adicionada a esta solução, sob agitação magnética. A redução completa dos íons Ag^+ foi confirmada pela mudança na coloração, de incolor para alaranjado (Ag_0). As suspensões preparadas foram armazenadas a 4-8°C e ao abrigo da luz durante 150 dias.

4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Para a síntese das nanopartículas de ouro, por um método “*bottom-up*”, foi preparada uma solução aquosa de cloridrato de ouro (HAuCl_3). Em seguida, uma quantidade pré-definida do extrato aquoso de *L. dentata* foi adicionada a esta solução, sob agitação magnética. A redução completa dos íons Au^{+3} foi confirmada pela mudança na coloração, de amarelo ouro para violeta (Au_0). As suspensões preparadas foram armazenadas a 4-8°C e ao abrigo da luz durante 150 dias.

4.4 ASSOCIAÇÃO COM METOTREXATO E ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)

Para a associação e estabilização das nanopartículas de prata ou das nanopartículas de ouro, a solução de nanopartículas foi colocada sob agitação magnética com uma quantidade pré-determinada de polietilenoglicol ($C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$), metotrexato ($C_{20}H_{22}N_8O_5$) e poli(álcool vinílico) ($(C_4H_6O_2)_n$) por um tempo pré-definido. As suspensões preparadas foram armazenadas a 4-8°C e ao abrigo da luz durante 150 dias.

4.5 ASSOCIAÇÃO COM METOTREXATO E VETORIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM BIOTINA

Para a associação e vetorização das nanopartículas de prata ou das nanopartículas de ouro, a solução de nanopartículas foi colocada sob agitação magnética com uma quantidade pré-definida de polietilenoglicol ($C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$), metotrexato ($C_{20}H_{22}N_8O_5$) e biotina ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$). As suspensões preparadas foram armazenadas a 4-8°C e ao abrigo da luz durante 150 dias.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.6.1 Análise por espectroscopia UV-Visível

A análise por espectroscopia no UV-Visível foi utilizada tanto para a avaliação da formação das nanopartículas, logo após a reação de redução de 60 minutos (T0), bem como para o monitoramento da estabilidade com 15 (T15), 30 (T30), 90 (T90) e 150 (T150) dias. As análises foram realizadas em equipamento UV-Vis Nir Varian® CARY 50, em modo scan, na faixa de 200-800 nm, com cubetas de quartzo.

4.6.2 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O diâmetro médio (nm) e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas desenvolvidas foram analisados com o uso do aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments®) por dispersão dinâmica da luz, com ângulo de incidência de 90° a 25°. As suspensões foram preparadas com água destilada na proporção 1:10 (v:v).

4.6.3 Microscopia de força atômica

Para a análise de microscopia de força atômica, foi utilizado o equipamento AFM SHIMADZU® SPM 9600, com um cantilever de silicone revestido de alumínio,

modelo NCRH-20 da empresa Nanoworld®, com 42 N/m de força constante e frequência de ressonância de 320 kHz e espessura de 4 μm . Os experimentos foram realizados em modo não-contato (contraste de fase).

4.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão

O diâmetro médio e o formato das nanopartículas de prata e de ouro sintetizadas também foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão em um equipamento TEM (JEOL JEM 1200 EX-II). Uma gota da amostra diluída foi colocada em uma grade de cobre (Cu) revestida com um filme fino e colocado para secagem. O equipamento foi operado com uma voltagem de aceleração de 200 kV. Durante as análises, também foram realizadas medidas dos diâmetros das partículas.

4.6.5 Análise de difração de raios X

As suspensões foram secas em estufa a 36°C até a formação de pó para a análise. As nanopartículas foram examinadas em difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku®), utilizando scans de 2°/minuto, de 5 a 80 Å, radiação K α de cobre (λ = 1.5418Å), corrente de 30 mA e voltagem de 40 kV.

4.6.6 Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Na análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, cada amostra foi preparada em pastilha por prensagem a frio, empregando brometo de potássio em grau espectroscópico (2% m/m) e o pó resultante da secagem da suspensão de nanopartículas. A leitura foi realizada em equipamento IR Prestige 21 (Shimadzu®) com 64 scans/minuto, resolução de 4 cm^{-1} e considerou-se a janela experimental de interesse de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a leitura da linha de base foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio puro.

4.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO EM CÉLULAS K562

A linhagem celular K562 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e se caracteriza pelo desenvolvimento em suspensão. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 2000 mg/L de bicarbonato de sódio e soro fetal bovino 10%. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

4.7.1 Ensaio do metabolismo celular por redução do MTT em células K562

Um dos ensaios de avaliação da viabilidade celular é a redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, o MTT, onde o anel de tetrazólio desta substância é clivado nas mitocôndrias ativas, formando cristais de formazano de coloração violeta. Quando solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), podem ser lidos por espectrofotometria correlacionando com o número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Uma alíquota de $1,75 \times 10^5$ células/mL da linhagem K562 foi adicionada a suspensão de nanopartículas na proporção 1:1 e semeada 500 μ L por poço, em placas de 24 poços. Como controle negativo, foi utilizada água estéril. Após o tempo de tratamento de 24 horas, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi desprezado e 400 μ L de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL foi adicionada às células, seguindo o método de (MOSMANN, 1983). Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazano. Para a solubilização desses cristais, 200 μ L de DMSO foi acrescentado. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 550 nm, em leitora de placas (Biotek®, μ Quant). Para o cálculo da viabilidade celular (%), utilizou-se a Equação 1.

Equação 1 - Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância média da amostra}}{\text{Absorbância média do controle}} \times 100 \quad (1)$$

4.7.2 Ensaio da integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células K562

A quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada é proporcional ao número de células lisadas pelo processo necrótico, ou seja, permeabilização da membrana plasmática (CHAN; MORIWAKI; ROSA, 2013). A fim de quantificar essa enzima, uma alíquota das células K562 na concentração $1,75 \times 10^5$ células/mL foi adicionada juntamente com a suspensão de nanopartículas na proporção 1:1 (v:v) e semeadas 500 μ L em placas de 24 poços. Como controle negativo, foi utilizada água estéril. Como controle positivo, foi colocado 20 μ L de

Triton X-100 1% para lise total das células. Após 24 horas de tratamento, a suspensão foi retirada e centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado. A determinação da atividade da LDH, foi mensurada no equipamento Quicklab® com o kit LDH (Ebram®) por meio de uma reação cinética. Foram adicionados 25 µL de cada amostra com 1000 µL do monoreagente. A absorbância foi determinada após 1, 2, 3 e 4 minutos em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm. Para o cálculo da atividade de LDH foi utilizada a Equação 2.

Equação 2 - Cálculo da atividade de LDH (U/L) a partir da variação da absorbância (ΔA) a cada minuto.

$$\text{Atividade de LDH} = \frac{\Delta A \text{ amostra/minuto}}{\Delta A \text{ calibrador/minuto}} \times \text{conc. do calibrador} \quad (2)$$

4.7.3 Análise do ciclo celular em células K562

Uma alíquota na concentração de 4×10^5 células/mL da linhagem K562 foi adicionada a suspensão de nanopartículas na proporção 1:1 (v:v) e semeada 500 µL em placas de 24 poços. Como controle negativo, foi utilizada água estéril. Após 24 horas de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi removido, o pellet celular foi ressuspendido em 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4, foi centrifugado novamente nas mesmas condições e o sobrenadante foi removido. Sobre o pellet de células foi adicionado 200 µL de tampão PSSI (50 µg/mL de iodeto de propídio, 0,1% de Triton X-100 e 50 µg/mL de RNase, preparados em tampão fosfato pH 7,4), e sendo incubado por 5 horas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram lidas em citômetro de fluxo (FACSCanto II da Becton & Dickinson®, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickinson®), avaliando-se um número aproximado de 20.000 eventos por amostra.

4.7.4 Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria em células K562

Uma alíquota de 4×10^5 células/mL da linhagem K562 foi adicionada à suspensão de nanopartículas na proporção 1:1 (v:v) e semeada 500 µL em placas

de 24 poços. Como controle negativo, foi utilizada água estéril. Após 24 horas de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi removido, o pellet celular foi ressuspensionado em 0,2 mL de tampão fosfato pH 7,4, foi novamente centrifugado (5 minutos a 1800 rpm) e o sobrenadante removido. Ao pellet de células foi adicionado 500 µL da solução de rodamina 123 (2,5 µM), sendo o sistema incubado por 10 minutos em condições de cultivo (37°C, 5% de CO₂). Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 7,4 e incubadas com 500 µL do mesmo tampão por 30 minutos. Na sequência, as amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II da Becton & Dickinson®, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickinson®), avaliando-se um número aproximado de 20.000 eventos por amostra.

4.7.5 Avaliação morfológica por corantes fluorescentes alaranjado de acridina e brometo de etídio em células K562

Para avaliar o possível mecanismo de morte celular, estão disponíveis testes de avaliação morfológica, dentre eles, o corante alaranjado de acridina, que permeia todas as células e faz com que o núcleo apresente coloração verde, e o brometo de etídio que só permeia as células que já perderam a integridade da membrana citoplasmática e torna o núcleo com coloração avermelhada (RIBBLE *et al.*, 2005).

Uma alíquota de 4x10⁵ células/mL da linhagem K562 foi adicionada a suspensão de nanopartículas na proporção 1:1 (v:v) e semeada 500 µL em placas de 24 poços. Como controle negativo, foi utilizada água estéril. Após 24 horas de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi removido e adicionado 10 µL da mistura de corantes alaranjado de acridina com brometo de etídio (200 µg/mL) às células sobre as lâminas.

A coloração foi visualizada em microscópio óptico de fluorescência Olympus® BX41 (filtro com excitação de 480/30 nm e emissão 535/40 nm) e os campos foram registrados com câmera fotográfica Olympus® DP71 acoplada.

Os critérios utilizados para a classificação das células submetidas a coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio, segundo RIBBLE *et al.* (2005), foram:

a) Células viáveis: núcleos normais e coloração verde;

- b) Células apoptóticas em fase inicial (membranas intactas): núcleo verde e brilhante, porém sem uniformidade, com condensação ou fragmentação da cromatina;
- c) Células apoptóticas em fase tardia (perda da integridade da membrana): com condensação de cromatina e áreas alaranjadas no núcleo;
- d) Células necróticas: núcleo laranja uniforme com perda da integridade de membrana.

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS 3T3

4.8.1 Ensaio do metabolismo celular por redução do MTT em células 3T3

A linhagem celular 3T3 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e se caracteriza pelo desenvolvimento de forma aderida. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 2000 mg/L de bicarbonato de sódio e soro fetal bovino 10%. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Este ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.7.1 empregando a linhagem 3T3 (fibroblastos).

4.8.1.1 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto (BADISA *et al.*, 2009). Foi calculado através da Equação 3 e considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 para indicar se a amostra é mais seletiva para células tumorais que células normais.

Equação 3 - Cálculo do índice de seletividade.

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{\% \text{ de células viáveis normais}}{\% \text{ de células viáveis tumorais}} \quad (3)$$

4.8.2 Ensaio da integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células 3T3

Esta análise foi conduzida conforme descrito no item 4.7.2 utilizando a linhagem 3T3 (fibroblastos).

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo que, quando necessário, foi empregado o teste *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Valores de P menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.03 (San Diego, CA, EUA).

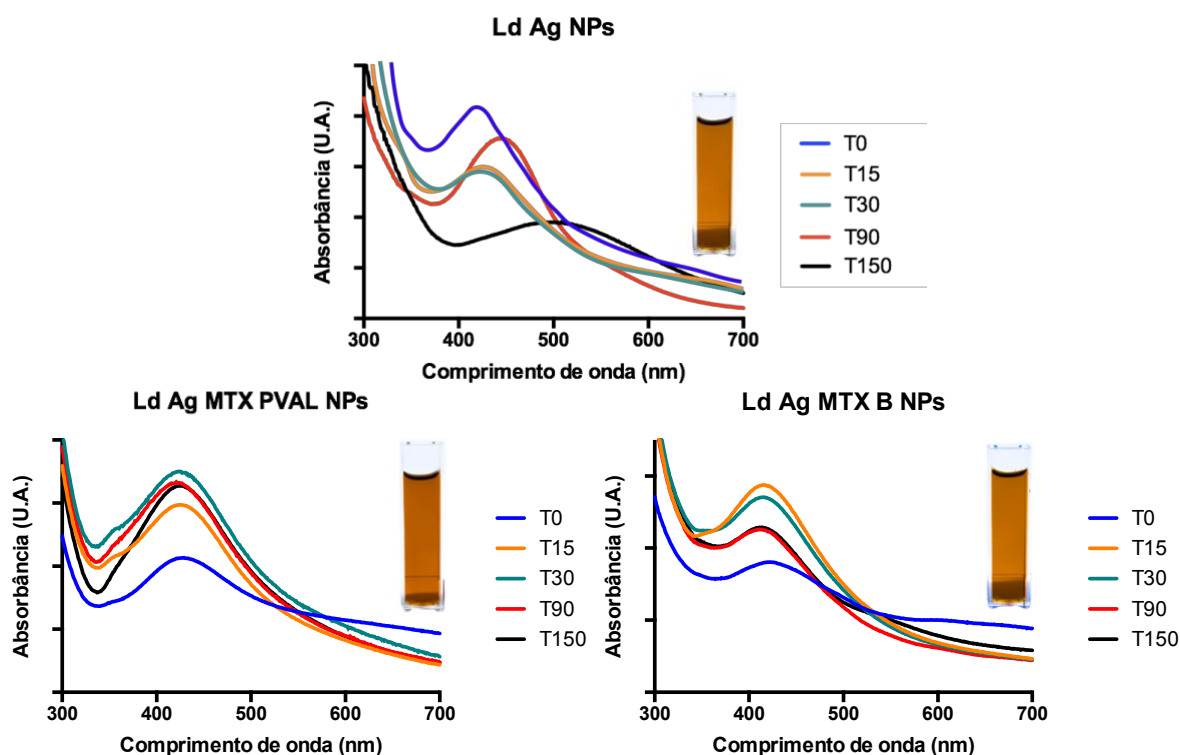
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Todas as nanopartículas de prata obtidas apresentaram mudança da cor amarelo pálido para uma coloração característica alaranjada.

Foram observados picos de absorção na espectroscopia UV-Vis em 417 nm para as nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), em 420 nm para as nanopartículas estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e em 415 nm para as nanopartículas vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (Figura 3).

Figura 3 - Espectros de UV-Vis das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), das nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) nos diferentes períodos de tempo (dias).



Fonte: A autora.

A análise por espectroscopia UV-Vis é usualmente empregada para nanopartículas metálicas, principalmente de ouro e prata. Estas nanopartículas

apresentam uma forte banda de absorção na região do visível, que é resultado da oscilação coerente dos elétrons livres induzidos pela interação com o campo eletromagnético formado pela luz incidente. Essa ressonância de plásmons de superfície (SPR) é característica de nanopartículas e não aparece quando o metal isolado é analisado (LEE; EL-SAYED, 2006).

O efeito de ressonância plasmônica de superfície pode revelar o formato e o tamanho da nanopartícula (ELEMIKE *et al.*, 2017; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). De acordo com a literatura, para as nanopartículas de prata, um pico de absorção próximo a 400 nm é característico de um tamanho aproximado de 20 nm e um formato esférico, sugerindo que as nanopartículas de prata, obtidas neste trabalho, apresentem estas mesmas características (BAC *et al.*, 2012; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

Um aumento no tamanho das nanopartículas resultaria em um deslocamento da banda plasmônica para regiões de maior comprimento de onda (ANTUNES *et al.*, 2013). Este aumento e aglomeração é dependente do agente de redução e estabilização, temperatura e pH (MATSUSHITA *et al.*, 2012).

ELEMIKE *et al.* (2017) utilizaram o extrato aquoso de uma outra espécie de *Lavandula*, *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel., e obtiveram nanopartículas esféricas de prata, que apresentaram um pico de absorção em 411 nm e um tamanho médio de 12,6 nm pela microscopia de transmissão, resultados próximos aos encontrados neste trabalho.

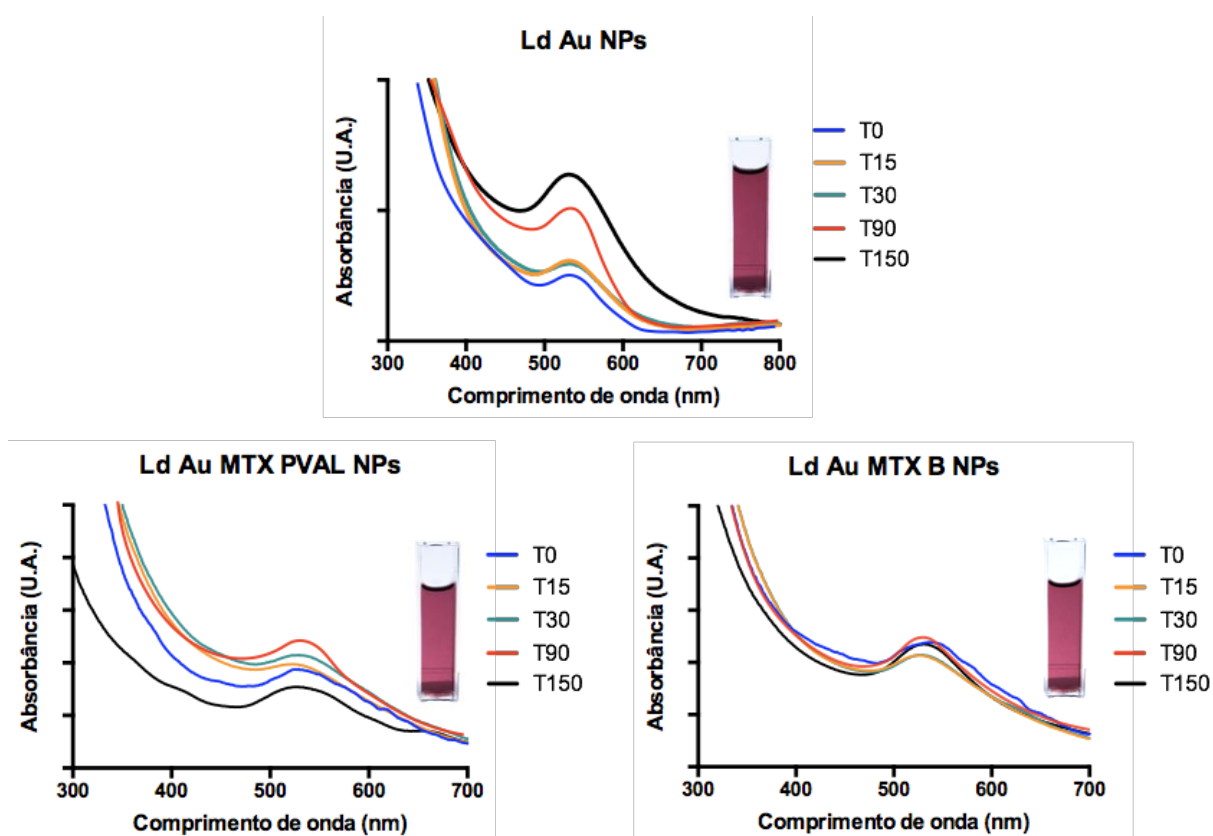
Por outro lado, todas as nanopartículas de ouro apresentaram uma mudança de cor amarelo ouro para uma coloração violeta, característica das nanopartículas deste metal (PATRA *et al.*, 2015).

Na espectroscopia UV-Vis foram observados picos de absorção em 527 nm para as nanopartículas de ouro (Ld Au NPs), 519 nm para as nanopartículas estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e 520 nm para as nanopartículas vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) (Figura 4). Segundo a literatura, um pico de absorbância em 520 nm é característico de nanopartículas de ouro esféricas (JÚNIOR *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2016).

SHANKAR *et al.* (2004) utilizaram o extrato de *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson para redução do sal de ouro e apresentou uma banda de

ressonância plasmônica em torno de 580 nm em temperatura ambiente que foi deslocada, após 90 minutos, para 500 nm confirmando a produção de nanopartículas em formato de prismas triangulares de ouro.

Figura 4 - Espectros de UV-Vis das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs), das nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e nanopartículas de ouro com biotina (Ld Au MTX B NPs) nos diferentes períodos de tempo (dias).



Fonte: A autora.

KUMAR *et al.* (2016) ao produzir nanopartículas triangulares e quase esféricas de ouro com extrato aquoso de *Lavandula angustifolia* Mill. observaram que quando as nanopartículas apresentavam formatos variados elas formavam mais de um pico quando analisadas por espectroscopia UV-Vis e que também eram atribuídos a grande variação de tamanho das nanopartículas obtidas, diferentemente do encontrado neste trabalho.

É importante mencionar que pode-se avaliar a estabilidade das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pelo UV-Vis, com a determinação de

mudanças na distribuição do tamanho das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Com os resultados obtidos, tanto as nanopartículas de prata como as nanopartículas de ouro, em que foram empregados os agentes estabilizantes e vetorizadores, apresentaram uma excelente estabilidade em função do tempo máximo de análise (cento e cinquenta dias), podendo ser observado nas Figuras 3 e 4.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

5.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

Os resultados obtidos para o diâmetro médio e para o potencial zeta estão apresentados na Tabela 1. As nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) apresentaram um diâmetro médio de 5,26 nm, enquanto as nanopartículas de ouro (Ld Au NPs) apresentaram um diâmetro médio de 20,61 nm. As nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) apresentaram um diâmetro médio de 17,30 nm e as nanopartículas de ouro estabilizadas com o mesmo polímero (Ld Au MTX PVAL NPs) apresentaram um diâmetro médio de 22,00 nm. Observou-se que as nanopartículas vetorizadas com biotina apresentaram um diâmetro médio maior sendo, 39,22 nm para as nanopartículas de prata (Ld Ag MTX B NPs) e 35,65 nm para as nanopartículas de ouro (Ld Au MTX B NPs).

O aumento no diâmetro médio das nanopartículas pode ser explicado pela incorporação dos materiais utilizados para a estabilização e vetorização das nanopartículas, o quais interagem na superfície do núcleo metálico. Ao final, espera-se que o poli(álcool vinílico) e a biotina formem um revestimento de superfície evitando assim a coalescência entre elas. Com estas interações, o espalhamento da luz encontra estas substâncias de superfície e consequentemente o diâmetro da molécula aumenta.

As nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) obtidas apresentaram um valor de potencial zeta de -17,1 mV e as nanopartículas de ouro (Ld Au NPs) um valor de potencial zeta de -9,17 mV. Para as nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) o valor encontrado foi de -7,00 e para as nanopartículas de ouro (Ld Au MTX PVAL NPs) o valor foi de -9,73. Já para as nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) o valor foi de -8,93 e de -5,46 para as nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX

B NPs).

O potencial zeta, ou potencial de superfície, é a razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Sabe-se que as nanopartículas que apresentam um valor de potencial zeta próximo a ± 30 mV sugerem uma maior estabilidade do sistema (MATSUSHITA *et al.*, 2012). Estes valores ideais de potencial zeta são encontrados em sistemas desenvolvidos em pH extremamente ácidos ou básicos. Quando o pH do sistema se encontra próximo da neutralidade (6,0 – 7,0), o potencial zeta pode estar fora da faixa esperada para um sistema estável, entretanto, ressalta-se que para a aplicabilidade de um sistema, na maioria dos sistemas biológicos, o pH deve estar próximo da neutralidade (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTO, 2008).

Tabela 1 - Resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas de prata e das nanopartículas de ouro.

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH
Nanopartículas de Prata				
Ld Ag NPs	5,26 ± 1,53	0,444	-17,1	7,0
Ld Ag MTX PVAL NPs	17,30 ± 4,29	0,447	-7,00	7,0
Ld Ag MTX B NPs	39,22 ± 13,11	0,746	-8,93	7,0
Nanopartículas de Ouro				
Ld Au NPs	20,61 ± 4,40	0,501	-9,17	7,0
Ld Au MTX PVAL NPs	22,00 ± 6,02	0,435	-9,73	7,0
Ld Au MTX B NPs	35,65 ± 9,43	0,584	-5,46	7,0

Fonte: A autora.

Após 150 dias de armazenamento ao abrigo da luz e sob refrigeração de 4-8°C as nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) apresentaram um aumento considerável no diâmetro médio passando de 5,26 para 116,8 nm, o que pode indicar o processo de aglomeração das partículas, uma vez que o índice de polidispersão também acompanhou este aumento (Tabela 2). Este resultado está compatível com o deslocamento do pico de absorção obtidos por UV-vis.

As nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au

PVAL NPs) também apresentaram um discreto aumento no diâmetro médio de 22,0 para 30,10 nm (Tabela 2). Observou-se, ainda, um pequeno deslocamento na análise por UV-vis, assim como no valor de polidispersão.

A nanopartícula de ouro (Ld Au NPs) teve seu diâmetro médio mantido durante os 150 dias, assim como seu índice de polidispersão. As demais nanopartículas (Ld Ag MTX PVAL NPs, Ld Ag MTX B NPs, Ld Au MTX PVAL NPs, Ld Au MTX B NPs) apresentaram uma diminuição no diâmetro médio e manutenção do índice de polidispersão, isso pode sugerir que o processo de redução continuou ocorrendo no período, mantendo a uniformidade das partículas em suspensão.

Tabela 2 - Resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas de prata e nanopartículas de ouro após 150 dias armazenado ao abrigo da luz e sob refrigeração 4-8°C.

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH
Nanopartículas de Prata				
Ld Ag NPs	116,8 ± 69,31	1,000	-8,59	7,0
Ld Ag MTX PVAL NPs	8,957 ± 2,22	0,681	-11,8	7,0
Ld Ag MTX B NPs	6,857 ± 1,42	0,532	-12,8	7,0
Nanopartículas de Ouro				
Ld Au NPs	20,46 ± 5,36	0,553	-34,9	7,0
Ld Au MTX PVAL NPs	30,10 ± 5,74	0,834	-16,8	7,0
Ld Au MTX B NPs	1,140 ± 0,20	0,576	-16,3	7,0

Fonte: A autora.

5.2.2 Microscopia de força atômica

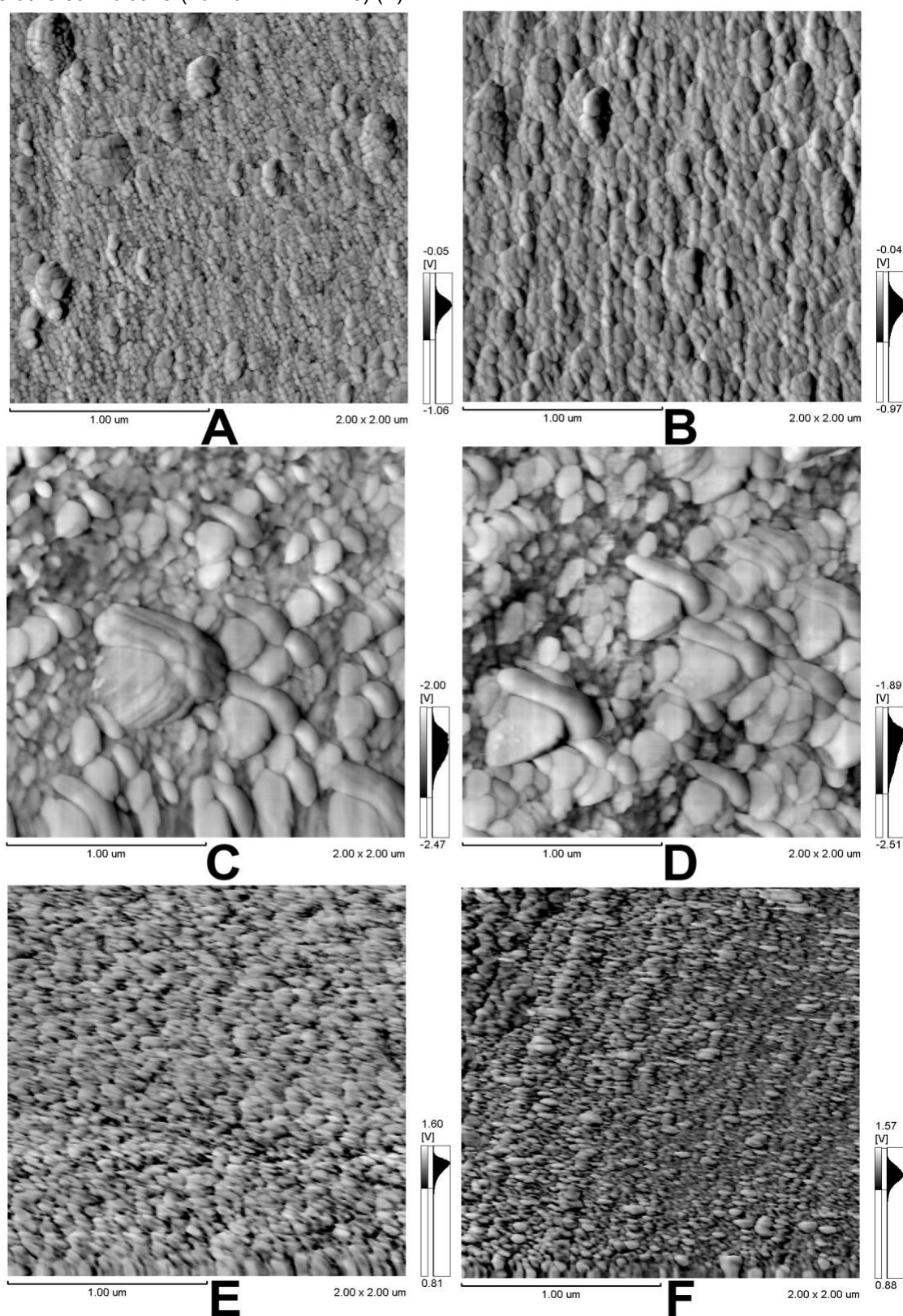
A técnica mais empregada para o estudo do tamanho e do formato das nanopartículas é a microscopia, com ela podemos obter a imagem direta das partículas e, além disso, este método é também imprescindível para a confirmação da homogeneidade da amostra (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A análise de superfície por microscopia de força atômica em modo não-contato, mostra que as nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), as nanopartículas de ouro (Ld Au NPs), as nanopartículas produzidas e estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs e Ld Au MTX PVAL NPs) e as nanopartículas obtidas

e vetorizadas com biotina (Ld Ag B NPs e Ld Au B NPs) apresentaram o mesmo diâmetro médio de $30,0 \pm 10,0$ nm (Figura 5). Por meio da imagem fornecida pela AFM, observa-se que as nanopartículas apresentaram formato esférico com superfície regular e baixa dispersão.

As nanopartículas estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs e Ld Au MTX PVAL NPs) (Figura 5 C e D) apresentaram um aspecto diferente das demais nanopartículas. Isto se deve ao fato de estarem recobertas pelo polímero formando uma película/filme, reduzindo a definição das nanopartículas pela imagem (UDDIN *et al.*, 2012). Quando a probe do microscópio realiza a passagem pela superfície do material, este revestimento dificulta a definição do material nanoparticulado nas imagens.

Figura 5 - Imagens de microscopia de força atômica das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (A) e ouro (Ld Au NPs) (B), nanopartículas de prata com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (C) e ouro com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (D), de prata com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (E) e ouro com biotina (Ld Au MTX B NPs) (F).



Fonte: A autora.

5.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Na imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 6) pode-se observar que as nanopartículas obtidas, tanto de prata como de ouro, apresentaram formato esférico e superfície lisa. O diâmetro médio encontrado para as nanopartículas metálicas desenvolvidas está apresentado na Tabela 3.

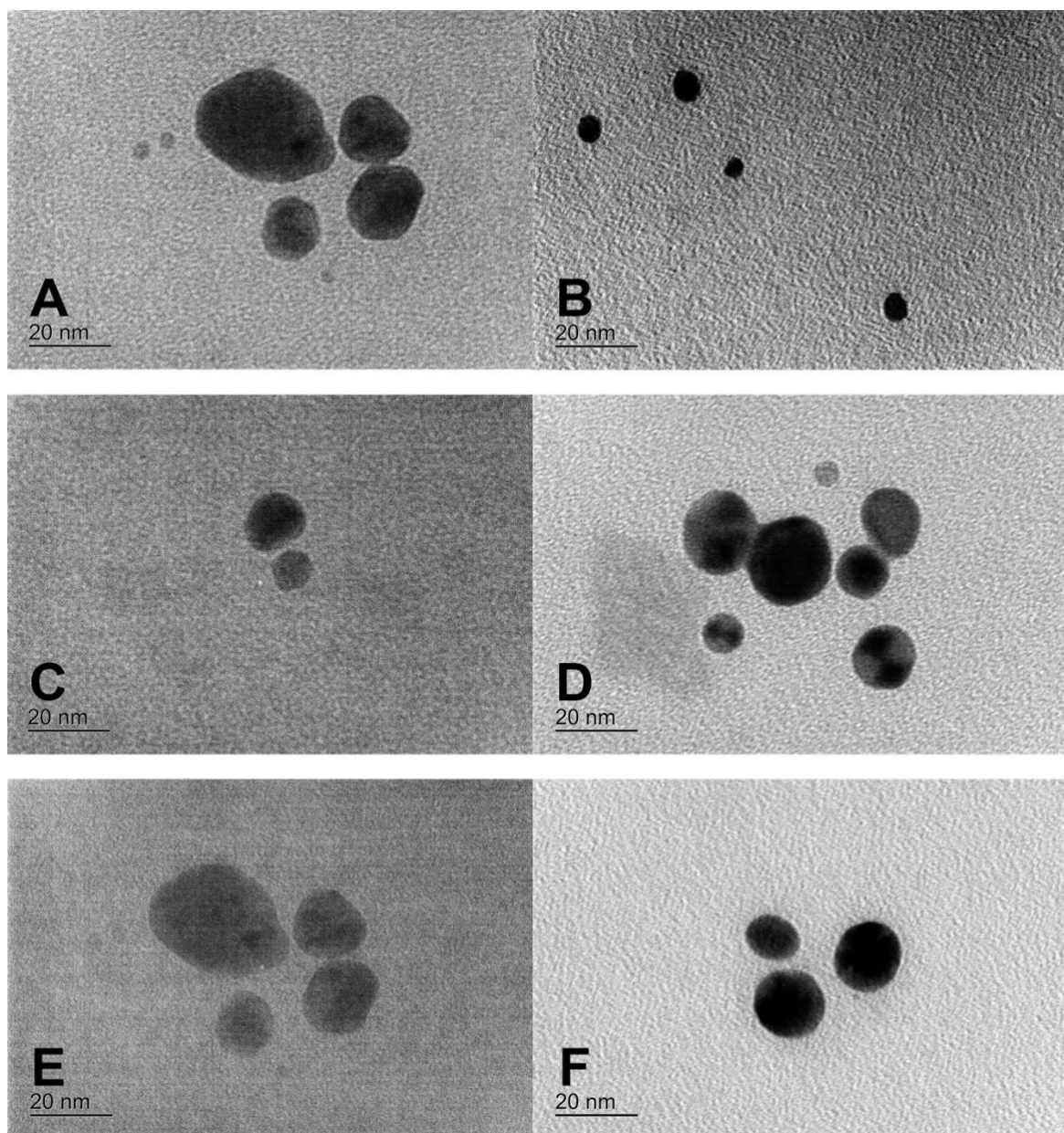
Tabela 3 - Diâmetro médio das nanopartículas, desenvolvidas com extrato aquoso de *L. dentata*, obtido por meio das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm)
Nanopartículas de Prata	
Ld Ag NPs	14,83 ± 11,43
Ld Ag MTX PVAL NPs	12,42 ± 5,31
Ld Ag MTX B NPs	11,28 ± 7,15
Nanopartículas de Ouro	
Ld Au NPs	6,20 ± 2,48
Ld Au MTX PVAL NPs	13,09 ± 5,28
Ld Au MTX B NPs	13,04 ± 6,06

Fonte: A autora.

Os tamanhos encontrados são próximos aos encontrados na microscopia de força atômica e aos encontrados na microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto, observou-se uma diferença no diâmetro médio quando comparados aos resultados obtidos pela técnica de espalhamento da luz e da microscopia de transmissão. Isto se deve ao fato da técnica de microscopia mensurar, principalmente, o núcleo metálico denso em elétrons, enquanto o DLS mede o encapsulamento e esfera de hidratação o que pode ser modificado pelas propriedades dos agentes utilizados juntamente com as nanopartículas (MORAIS *et al.*, 2012).

Figura 6 - Imagens de microscopia de transmissão das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (A) e ouro (Ld Au NPs) (B), nanopartículas de prata com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (C) e ouro com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (D), de prata com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (E) e ouro com biotina (Ld Au MTX B NPs) (F).



Fonte: A autora.

Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, um estudo realizado com o extrato aquoso de *Lavandula angustifolia* Mill. para produzir nanopartículas de ouro com auxílio de ultrassom, obteve partículas de dois formatos diferentes, quase esféricas e triangulares, com uma ampla variação de diâmetro médio, entre 30-300 nm (KUMAR *et al.*, 2016), o que pode ser explicado principalmente pela composição do extrato utilizado. UPSON *et al.* (2000) descreve que as espécies de *Lavandula*

sp. podem apresentar diversos metabólitos secundários como os flavonoides (genkwanina, luteolina, apigenina), porém a presença e a quantidade dos mesmos podem variar entre as espécies, de acordo com o local de cultivo, com as condições de cultivo (exposição solar, umidade, solo), entre outras. Isto pode definir as diferentes características encontradas dentre uma mesma espécie, uma vez que a substância redutora utilizada é um fator determinante para a definição do tamanho (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Já está bem estabelecido que o formato das nanopartículas tem efeito sobre a sua interação com as células. Um estudo recente mostrou que as nanopartículas com formato esférico apresentam uma taxa de internalização mais rápida, seguida pelas formas cúbicas, bastões e por último os discos. Com isso, pode-se supor que as nanopartículas menores e esféricas, apresentam uma maior toxicidade. Entretanto, esta suposição não se aplica às nanopartículas que apresentam revestimento de superfície, uma vez que ocorrem alterações nos comportamentos de solubilidade, absorção e de distribuição no organismo (JIA *et al.*, 2017).

5.3.4 Análise por difração de raios X

A técnica de difração de raios X é fundamental no estudo da matéria condensada, pois esta permite a investigação do arranjo ordenado dos sólidos (simetria cristalina, distâncias interplanares, defeitos estruturais).

Os picos observados a partir do difratograma de raios X das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (Figura 7 A) combinam perfeitamente com a estrutura cúbica de face centrada (FCC) da prata. Podem ser vistos quatro picos em torno de 2θ : 38° , 44° , 65° e 78° correspondendo aos planos de rede (111), (200), (220) e (311), respectivamente. Além dos picos das nanopartículas de prata, podem ser visualizados picos referentes à presença de AgCl sólido em 2θ : 27° , 32° e 46° , indicando a presença de cloreto em alguma etapa da síntese (BAGHERZADE; TAVAKOLI; NAMAIEI, 2017).

No difratograma da nanopartícula de prata estabilizada com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (Figura 7 B) fica claro também a presença dos picos do polietilenoglicol (2θ de 19° , 23° e 32°). Além disso, comparando-se ao difratograma das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), há uma inversão entre as intensidades dos picos referentes aos planos (111) e (200), bem como um

deslocamento nos valores de máximo de 2θ . Isto demonstra uma forte influência dos estabilizadores na estrutura das partículas.

O difratograma das nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (Figura 7 C), mostra o padrão de difração da biotina. Como no caso anterior, os valores máximos de 2θ estão deslocados, bem como as intensidades de pico entre os planos de rede estão trocados, mostrando a influência deste composto na estrutura da nanopartícula.

De modo similar, os picos observados no difratograma de raios X das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs) (Figura 8 A) combinam perfeitamente com a estrutura cúbica de face centrada (FCC) do ouro. Podem ser vistos quatro picos em torno de 2θ : 38° , 44° , 64° e 77° correspondendo aos planos de rede (111), (200), (220) e (311), respectivamente (NEJAD; BONJAR; KHALEGHI, 2015)

As variações nos difratogramas das nanopartículas de ouro modificadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e biotina (Ld Au MTX B NPs) seguem o mesmo padrão do observado para as nanopartículas de prata, demonstrado na Figura 8 B e C, respectivamente.

A difração de raios X é um método conveniente para determinar o tamanho médio de nanocristalitos em materiais nanocristalinos. Neste sentido, é importante destacar que tamanho de cristalito não é um sinônimo para tamanho de partícula, já que o padrão de difração de raios X é sensível ao tamanho dos cristalitos que formam as partículas.

O primeiro método para a determinação do tamanho médio de nanocristalitos foi proposto por Paul Scherrer, em 1918 (MONSHI; FOROUGHI; MONSHI, 2012), e pode ser descrita conforme a Equação 4.

Equação 4 - Equação de Debye-Scherrer para a obtenção do diâmetro de partícula.

$$L = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (4)$$

Onde:

L = tamanho médio do nanocristalito (em unidades de comprimento).

β = valor da largura de pico integrada (em unidade de radiano).

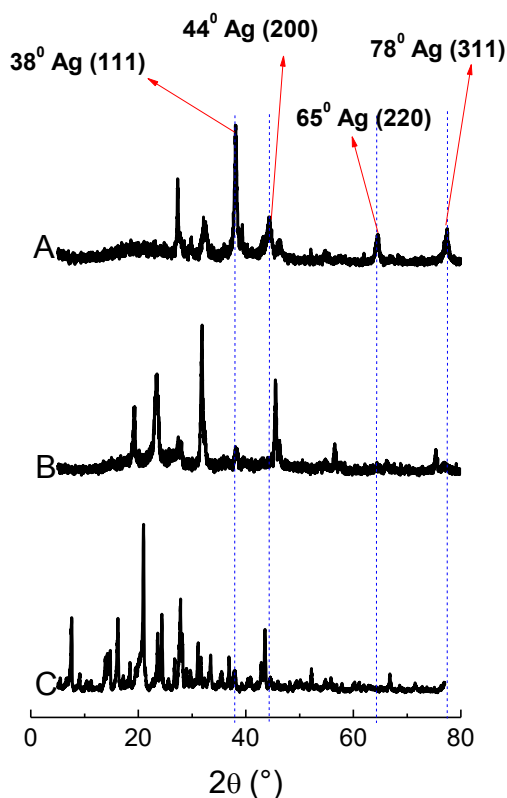
θ = ângulo correspondente a difração (pode ser usado em unidades de grau ou radiano).

λ = comprimento de onda da fonte de raios X (usado na mesma unidade de L).

K = constante relacionada à forma de cristalito (sem unidades).

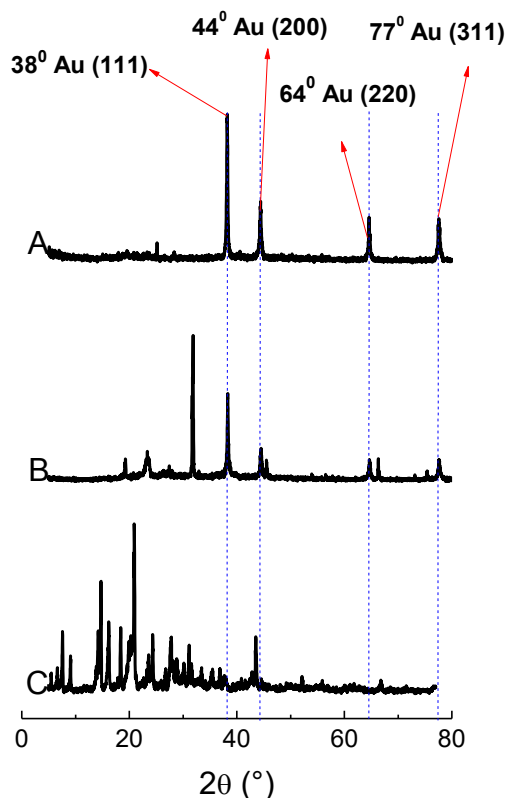
Esta equação deve ser aplicada com certo cuidado, uma vez que o padrão de difração de raios X é influenciado por muitos fatores, tais como formato dos cristalitos, tamanho dos cristalitos, tensão existente entre os cristalitos, existência de orientação preferencial, além de fatores experimentais.

Figura 7 - Difratomogramas de raios X das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (A), das nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) (B) e das nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) (C).



Fonte: A autora.

Figura 8 - Difratomogramas de raios X das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs) (A), das nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (B) e das nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) (C).



Fonte: A autora.

Entretanto, de forma aproximada, a equação de Scherrer pode ser utilizada, principalmente na comparação de amostras obtidas de forma semelhante. Assim, o fator b pode ser aproximado como o valor da largura máxima do pico a meia altura (FWHM - Full Width Half Maximum) se K for usado como sendo 0,89. Entretanto essa aproximação é válida para cristais esféricos formados por células unitárias cúbicas. Além disso, pode-se realizar o cálculo do tamanho médio dos cristalitos utilizando-se o pico de maior intensidade, entretanto deve-se ter em mente que esse será o tamanho médio dos cristalitos ao longo da direção cristalográfica determinada por aquele pico.

Desta forma, pode-se estimar o tamanho dos cristalitos presentes nas nanopartículas obtidas por meio da equação de Scherrer utilizando o pico do plano (111), observados nos difratogramas das nanopartículas desenvolvidas. Os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores obtidos para o tamanho de partícula por meio da equação de Scherrer.

Parâmetros								
Nanopartículas	K	λ^* (nm)	β (graus)	β^{**} (radiano)	2θ (graus)	θ (graus)	$\cos \theta$	L (nm)
Nanopartículas de Prata								
Ld Ag NPs	0,89	0,15406	0,452	0,007892	38,10	19,05	0,945	18,4
Ld Ag MTX PVAL NPs	0,89	0,15406	0,788	0,013758	38,15	19,07	0,945	10,5
Ld Ag MTX B NPs	0,89	0,15406	0,534	0,009324	37,90	18,95	0,946	15,5
Nanopartículas de Ouro								
Ld Au NPs	0,89	0,15406	0,256	0,004470	38,30	19,15	0,945	32,5
Ld Au MTX PVAL NPs	0,89	0,15406	0,241	0,004208	38,20	19,10	0,945	34,5
Ld Au MTX B NPs	0,89	0,15406	0,580	0,010127	37,71	18,85	0,946	14,3

Fonte: A autora.

Notas: * - o comprimento de onda da linha Ka1 da fonte de Cu.

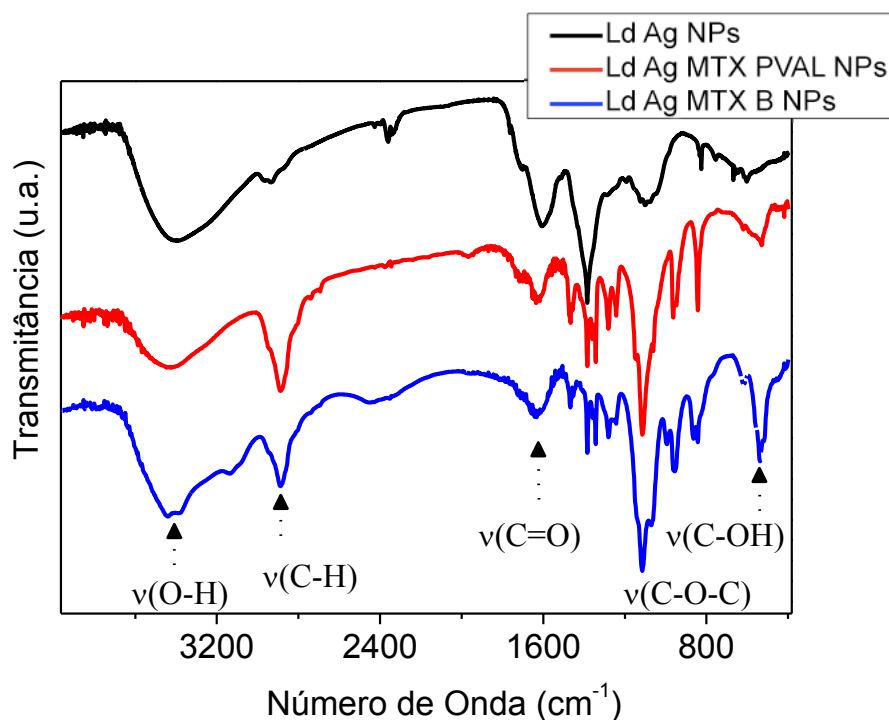
** - ângulo em radianos = (ângulo em graus x 22)/(7 x 180) = (ângulo em graus x 0,01746).

Todos os valores de L foram calculados com direção preferencial ao plano (111). Deve-se considerar que o erro embutido no cálculo realizado para as nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs), bem como para as nanopartículas de ouro vetorizada com biotina (Ld Au MTX B NPs), devido a baixa resolução dos picos apresentados nos difratogramas obtidos para esses materiais.

5.3.5 Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

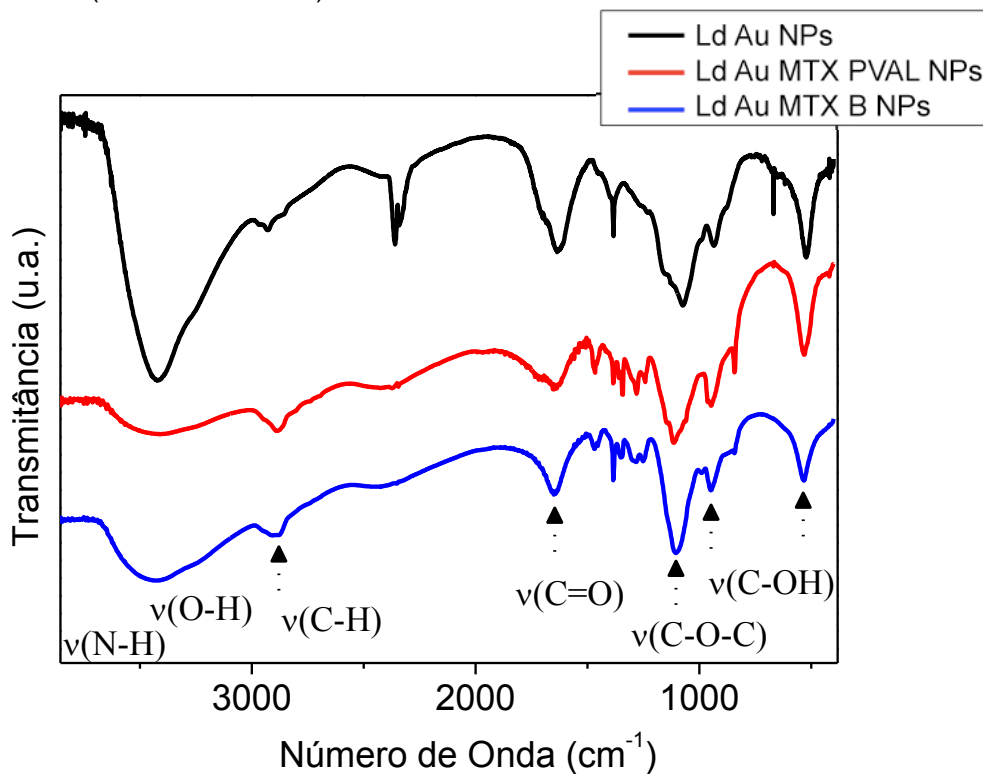
A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi empregada com o objetivo de se verificar eventuais diferenças de alterações moleculares causadas após a incorporação do poli(álcool vinílico) e da biotina na produção das duas variações de nanopartículas, obtidas com prata e ouro na presença de extrato, polietilenoglicol e metotrexato. As Figuras 9 e 10 ilustram os espectros de FTIR das nanopartículas de prata e ouro reduzidas com extrato aquoso de *L. dentata* em comparação com os demais espectros das nanopartículas obtidas com poli(álcool vinílico) e biotina.

Figura 9 - Espectros de FTIR da nanopartículas de prata (Ld Ag NPs), das nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e das nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs).



Fonte: A autora.

Figura 10 - Espectros de FTIR das nanopartículas de ouro (Ld Au NPs), das nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e das nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs).



Fonte: A autora.

De uma maneira geral, os espectros obtidos para as nanopartículas de prata e de ouro não mostraram maiores alterações nos grupos funcionais do extrato, polietilenoglicol e metotrexato em virtude da presença do agente de estabilização (poli(álcool vinílico)) e vetorização (biotina) nas nanopartículas.

Ao analisarmos os espectros das nanopartículas obtidas com poli(álcool vinílico) observou-se na região de alta energia uma banda alargada e intensa em 3428 e 3430 cm^{-1} , respectivamente às nanopartículas de prata (Ld Ag MTX PVAL NPs) e de ouro (Ld Au MTX PVAL NPs), atribuída à vibração do estiramento do grupo -OH do polietilenoglicol (NIU; LUO; LI, 2007). Em outras regiões, esses espectros apresentaram as absorções de grupos específicos associados à amostra de poli(álcool vinílico) pura (-OH, -CO, -CH₂). Observou-se que alguns sinais característicos em 2859, 1377 e 1258 cm^{-1} , normalmente associados ao estiramento do grupo alquila CH, ao dobramento do grupo CH e ao dobramento do grupo funcional C-O (SUDHAMANI; PRASAD; SANKAR, 2003), estão presentes em ambos espectros com pequeno deslocamento como consequência de interações de hidrogênio primária e secundária. Por exemplo, o estiramento dos grupos OH nas nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) e de ouro (Ld Au NPs) são deslocados para 2885 e 2883 cm^{-1} , respectivamente. Além disto, a banda observada em 1104 e 1114 cm^{-1} pode ser atribuída à presença estiramento C-O-C do polietilenoglicol, respectivamente às nanopartículas de prata (Ld Ag MTX PVAL NPs) e de ouro (Ld Au MTX PVAL NPs) estabilizadas com poli(álcool vinílico).

Os espectros obtidos das nanopartículas vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs e Ld Au MTX B NPs) são constituídos por uma banda alargada entre 3438 e 3312 cm^{-1} atribuída à sobreposição do estiramento O-H dos grupos presentes no extrato com o estiramento assimétrico e simétrico N-H da biotina (KUMAR *et al.*, 2017; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991). Os pequenos picos agudos em torno de 2890 cm^{-1} surgem devido ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo C-H.

A banda alargada de baixa intensidade em 1630 e 1650 cm^{-1} , respectivamente as nanopartículas de prata (Ld Ag MTX B NPs) e de ouro (Ld Au MTX B NPs) vetorizadas com biotina, é atribuída à vibração do estiramento C=O do grupo CONH, presente na biotina. O pico em torno 1468 e 1381 cm^{-1} é atribuído às ligações C-H e N-H, e finalmente a banda intensa em aproximadamente 1070 e

1090 cm^{-1} , respectivamente às nanopartículas prata (Ld Ag MTX B NPs) e de ouro (Ld Au MTX B NPs), é decorrente do estiramento CO do COOH da biotina. Assim como nos espectros das nanopartículas obtidas com poli(álcool vinílico), é constatada a presença do polietilenoglicol pela banda do estiramento C-O-C em 1115 cm^{-1} nos espectros dessas nanopartículas (KUMAR *et al.*, 2017).

5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO EM CÉLULAS K562

5.4.1 Ensaio de metabolismo celular por redução do MTT em células K562

Os resultados obtidos para o potencial citotóxico das nanopartículas desenvolvidas sobre as células K562 no período de 24 horas estão representados na Figura 11.

Todas as nanopartículas promoveram redução na viabilidade celular, assim como o fármaco metotrexato e o extrato aquoso de *L. dentata* utilizado na produção das nanopartículas metálicas. As amostras testadas apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas com o controle negativo.

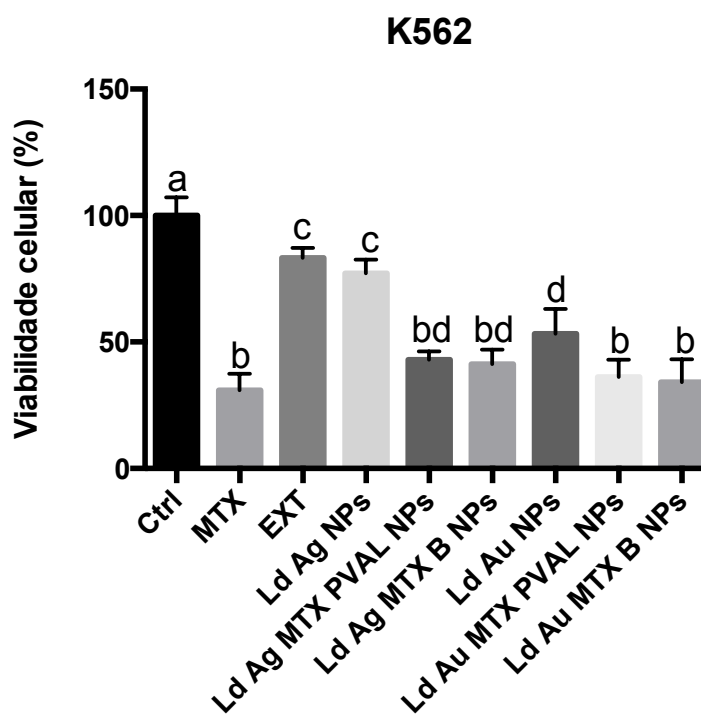
O extrato aquoso obtido de *L. dentata* apresentou uma redução de 16,74% na viabilidade celular e não revelou diferença estatística significativa com os resultados apresentados pela ação das nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) que promoveu a redução da viabilidade celular em 22,78%. A redução apresentada por estas amostras é pouco expressiva quando comparadas com os demais tratamentos.

As nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag PVAL NPs) e vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) promoveram uma redução de 56,89% e 58,68%, enquanto as nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au PVAL NPs) apresentaram uma redução de 63,83% e as vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) uma redução de 65,77%. Nenhuma das nanopartículas descritas apresentou diferença estatística significativa quando comparadas com o metotrexato livre, o qual apresentou uma redução na viabilidade celular de 69,09%.

A formulação de nanopartículas metálicas contendo ouro (Ld Au NPs) reduziu 46,72% na viabilidade celular e apresentou diferença estatística com as nanopartículas, exceto as formulações de prata tanto com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e de prata com biotina (Ld Ag MTX B NPs).

Ressalta-se, neste ensaio, a maior redução na viabilidade das células leucêmicas da formulação desenvolvida com nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) com uma redução de 65,77%.

Figura 11 - Viabilidade celular (%) de células K562 frente aos diferentes tratamentos.



Fonte: A autora.

Notas: Letras diferentes mostram diferenças estatísticas significativas. Ctrl : controle negativo; MTX: metotrexato; EXT: extrato; Ld Ag NPs: nanopartículas de prata; Ld Ag MTX PVAL NPs: nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Ag MTX B NPs: nanopartículas de prata vetorizadas com biotina; Ld Au NPs: nanopartículas de ouro; Ld Au MTX PVAL NPs: nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Au MTX B NPs: nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina.

As nanopartículas metálicas de prata (Ld Ag NPs) e de ouro (Ld Au NPs) produzidas neste trabalho, com extrato aquoso de *L. dentata*, já apresentaram toxicidade frente às células tumorais, mesmo sem a presença do fármaco metotrexato, o que poderia atribuir um efeito sinérgico ao tratamento, aumentando a entrada e a citotoxicidade do fármaco nas células quando colocadas em contato com esta linhagem. Diferentemente do descrito por MURAWALA *et al.* (2014), que produziram nanopartículas de ouro com albumina de soro bovino e não apresentaram toxicidade em células MCF-7, linhagem de câncer de mama humano,

porém quando conjugadas com o fármaco metotrexato, passaram a reduzir a viabilidade celular em 50%.

5.4.2 Ensaio de integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células K562

A necrose é caracterizada pelo aumento de tamanho, rompimento de estruturas intracelulares e de membrana plasmática. Este mecanismo de morte celular está relacionado com o aumento na liberação do fator de necrose tumoral (TNF) e da enzima LDH no espaço extracelular (CHAN; MORIWAKI; ROSA, 2013).

Comparando-se ao controle negativo, não houve aumento estatisticamente significativo na atividade de LDH liberada pelas células K562 após o tratamento com as nanopartículas. O mesmo resultado foi observado para o extrato e o fármaco metotrexato (Figura 12).

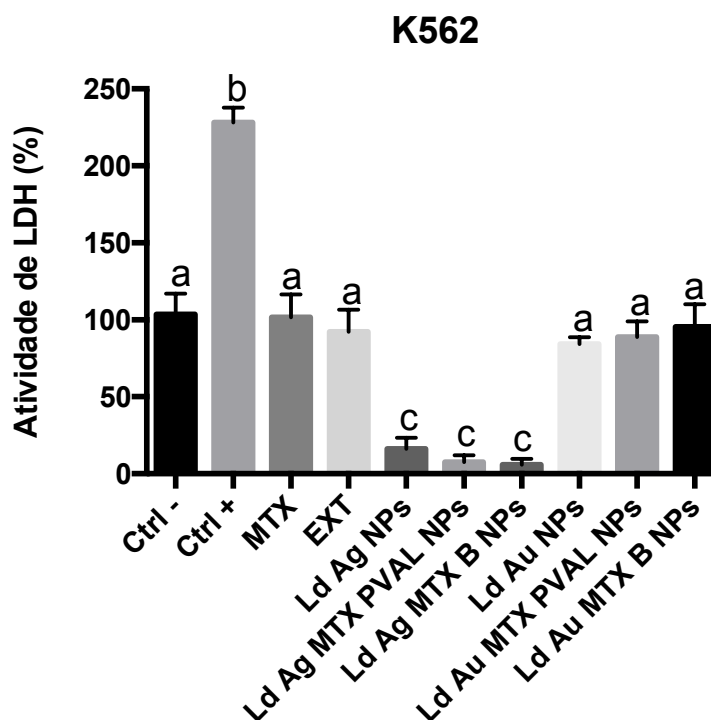
Este resultado indica que as amostras testadas não promoveram o rompimento da membrana celular de forma significativa. Assim, é possível sugerir que o principal processo de morte celular induzido pelas amostras testadas não seja por necrose, dado a manutenção dos valores de liberação da enzima LDH.

Considerando os resultados, sugere-se que a via de morte celular principal induzida seja apoptótica. A apoptose é um processo complexo que envolve diferentes vias de sinalização e uma infinidade de alterações através do processo de transformação neoplásica, progressão e metástase (MURAWALA *et al.*, 2014).

As nanopartículas de prata (Ld Ag NPs, Ld Ag MTX PVAL NPs, Ld Ag MTX B NPs) promoveram uma redução significativa na liberação da enzima, o que indica que tenha sido causada devido ao rápido processo de morte celular nas primeiras horas de ensaio (Figura 12).

Diferentemente do exposto, um estudo avaliou a exposição de células de linfossarcoma-leucemia à nanopartículas de prata por 24 horas e resultou em um potencial citotóxico seguido de um aumento na liberação de LDH. Além disso, mostrou que as nanopartículas com 100 nm de diâmetro apresentaram maior citotoxicidade quando comparadas com as de 15 nm (HUSSAIN *et al.*, 2005).

Figura 12 - Porcentagem de liberação da enzima lactato desidrogenase em células K562 após 24 horas de tratamento.



Fonte: A autora.

Notas: Letras diferentes mostram diferenças estatísticas significativas. Ctrl -: controle negativo; Ctrl +: controle positivo; MTX: metotrexato; EXT: extrato; Ld Ag NPs: nanopartículas de prata; Ld Ag MTX PVAL NPs: nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Ag MTX B NPs: nanopartículas de prata vetorizadas com biotina; Ld Au NPs: nanopartículas de ouro; Ld Au MTX PVAL NPs: nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Au MTX B NPs: nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina.

5.4.3 Análise do ciclo celular em células K562

O ciclo celular inicia na fase G1, nesta fase, a célula aumenta de tamanho e parte para síntese do DNA, denominada fase S. Na próxima fase, a fase G2, as proteínas necessárias para a divisão são sintetizadas e na fase M, a última, as células se dividem e originam duas células filhas que retornarão para a fase G1, já as células que entram em latência temporária entram na fase G0 (KIM *et al.*, 2011). A observação das células nas diferentes fases do ciclo celular é importante para o monitoramento da citotoxicidade e a sua eficiência em alterar os mecanismos normais de proliferação (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Quando as células perdem parte do seu DNA, ocorre um aumento de células na fase sub G0, essas células são consideradas “lixo” ou restos apoptóticos. Este

aumento foi evidenciado nas nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) e nas vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) e também nas nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) (Tabela 5).

No caso das nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) observa-se que não houveram mudanças significativas que pudessem indicar um processo necrótico. A ativação deste processo levaria a um aumento na resposta inflamatória e ativação do sistema imune, o que seria indesejado. Os resultados obtidos indicam que a via de morte celular provavelmente não está relacionada com um processo necrótico.

Grande parte das nanopartículas metálicas estudadas geram uma parada de ciclo celular na fase G2/M, provavelmente causada por danos no DNA, gerados por estresse oxidativo e o efeito precoce é evidenciado na progressão do ciclo (MAHMOUDI *et al.*, 2011).

Esse estresse oxidativo é causado pelo acúmulo de nanopartículas metálicas no interior das células, que promovem várias respostas celulares e interagem intensamente com biomoléculas, como moléculas lipídicas e proteicas promovendo fortes ligações que poderiam comprometer outras funções celulares como expressão gênica e levar a um processo apoptótico (LOPEZ-CHAVES *et al.*, 2018; JEYARAJ *et al.*, 2014).

Entretanto, nas nanopartículas desenvolvidas no presente trabalho, isto não foi observado, mesmo apresentando altos valores de redução da viabilidade. Isto se deve a natureza inerte das nanopartículas obtidas, a alta biocompatibilidade dos materiais utilizados e a propriedades únicas das partículas desenvolvidas para a finalidade aplicada.

Outro fator a se considerar, é a modificação da superfície das nanopartículas pelo polietilenoglicol, uma vez que é uma substância inerte, não apresenta toxicidade, induz uma maior absorção das nanopartículas pelas células em tratamento, o pode levar a uma maior redução na viabilidade, sendo assim, pode ser considerada uma alternativa para reduzir a toxicidade e aumentar a biocompatibilidade (JIA *et al.*, 2017).

Tabela 5 - Distribuição celular nas diferentes fases do ciclo na linhagem K562.

DISTRIBUIÇÃO NAS FASES DO CICLO – K562				
TRATAMENTO	Sub G0	G0/G1	S	G2/M
Controle negativo	13,41 ± 2,97 _a	40,59 ± 0,43 _a	21,68 ± 0,60 _a	26,10 ± 1,19 _a
Nanopartículas de Prata				
Ld Ag MTX PVAL NPs	28,00 ± 2,20 _b	26,75 ± 2,35 _b	21,81 ± 2,07 _{ab}	23,44 ± 0,18 _{ab}
Ld Ag MTX B NPs	20,24 ± 3,77 _{bc}	30,01 ± 0,15 _{cb}	22,97 ± 1,90 _{abc}	25,76 ± 2,15 _{abc}
Nanopartículas de Ouro				
Ld Au MTX PVAL NPs	24,14 ± 1,88 _{bc}	29,63 ± 0,39 _{bcd}	18,33 ± 1,78 _{ab}	29,12 ± 0,51 _{acd}
Ld Au MTX B NPs	13,64 ± 2,26 _{ac}	34,92 ± 1,65 _{acd}	22,38 ± 1,06 _{abc}	27,75 ± 1,63 _{acd}

Fonte: A autora.

Notas: Diferentes letras mostram diferenças estatísticas.

5.4.4 Análise do potencial transmembrânico de mitocôndria em células K562

A indução de apoptose pode ser evidenciada por alterações morfológicas como encolhimento celular e condensação da cromatina, através de marcadores bioquímicos e pela análise de despolarização de membrana mitocondrial. Uma apoptose mediada por esta via pode apresentar um potencial terapêutico contra doenças hematológicas (GAO *et al.*, 2012).

Conforme pode ser observado na Tabela 8, as nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs), as vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) e as nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) não apresentaram potencial para despolarizar a membrana mitocondrial, em contrapartida, as nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) apresentaram grande potencial de despolarização, diferindo estatisticamente de todas as outras amostras testadas. Este resultado caracteriza um processo de morte celular programada, um processo apoptótico.

Tabela 6 - Porcentagem de polarização e despolarização mitocondrial após 24 horas de tratamento com a linhagem K562.

% DE DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL – K562		
TRATAMENTO	POLARIZADA	DESPOLARIZADA
Controle negativo	73,05 ± 1,34 _a	26,95 ± 1,34 _a
Nanopartículas de Prata		
Ld Ag MTX PVAL NPs	70,56 ± 0,22 _{ab}	29,44 ± 0,22 _{ab}
Ld Ag MTX B NPs	71,22 ± 0,89 _{abc}	28,77 ± 0,89 _{abc}
Nanopartículas de Ouro		
Ld Au MTX PVAL NPs	72,63 ± 0,63 _{abc}	27,37 ± 0,63 _{abc}
Ld Au MTX B NPs	59,99 ± 0,53 _d	40,01 ± 0,53 _d

Fonte: A autora.

Notas: Diferentes letras mostram diferenças estatísticas.

O corante utilizado na análise de despolarização, rodamina 123 é um corante fluorescente lipofílico que ao entrar em contato com as mitocôndrias íntegras emite uma fluorescência verde brilhante. Quando esta fluorescência diminui, indica um possível dano mitocondrial associado a despolarização de membrana. Um resultado próximo ao descrito neste trabalho, foi encontrado quando células de câncer de cólon foram tratadas com nanopartículas de ouro, produzidas com extrato aquoso de *Abutilon indicum* (L.) Sweet, indicando um possível processo apoptótico (MATA; NAKKALA; SADRAS, 2016).

Outro estudo evidenciou também a despolarização da membrana com nanopartículas de prata desenvolvidas com o extrato aquoso de *Phyllanthus emblica* L. Quando produzidas com o extrato, a atividade apoptótica foi aumentada assim como a citotoxicidade das nanopartículas de prata frente a células epiteliais humanas (ROSARIN *et al.*, 2012).

Um dos relatos mostra que as nanopartículas de ouro podem induzir uma redução na proliferação celular, alteração nos mecanismos oxidativos por geração de calor intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio, alterando assim o potencial de membrana mitocondrial, peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e, finalmente, apoptose (RIZK; CHRISTOFOROU; LEE, 2016; ROSARIN *et al.*, 2012).

5.4.5 Avaliação morfológica por meio do emprego dos corantes fluorescentes alaranjado de acridina com brometo de etídio

A exposição das células a agentes químicos tóxicos ou fármacos pode levar a mudanças significativas no formato e na morfologia (MURAWALA *et al.*, 2014). Por meio da análise microscópica utilizando os corantes alaranjado de acridina e brometo de etídio podemos classificar as células em viáveis, em processo de apoptose inicial ou tardia e necróticas de acordo com as características apresentadas.

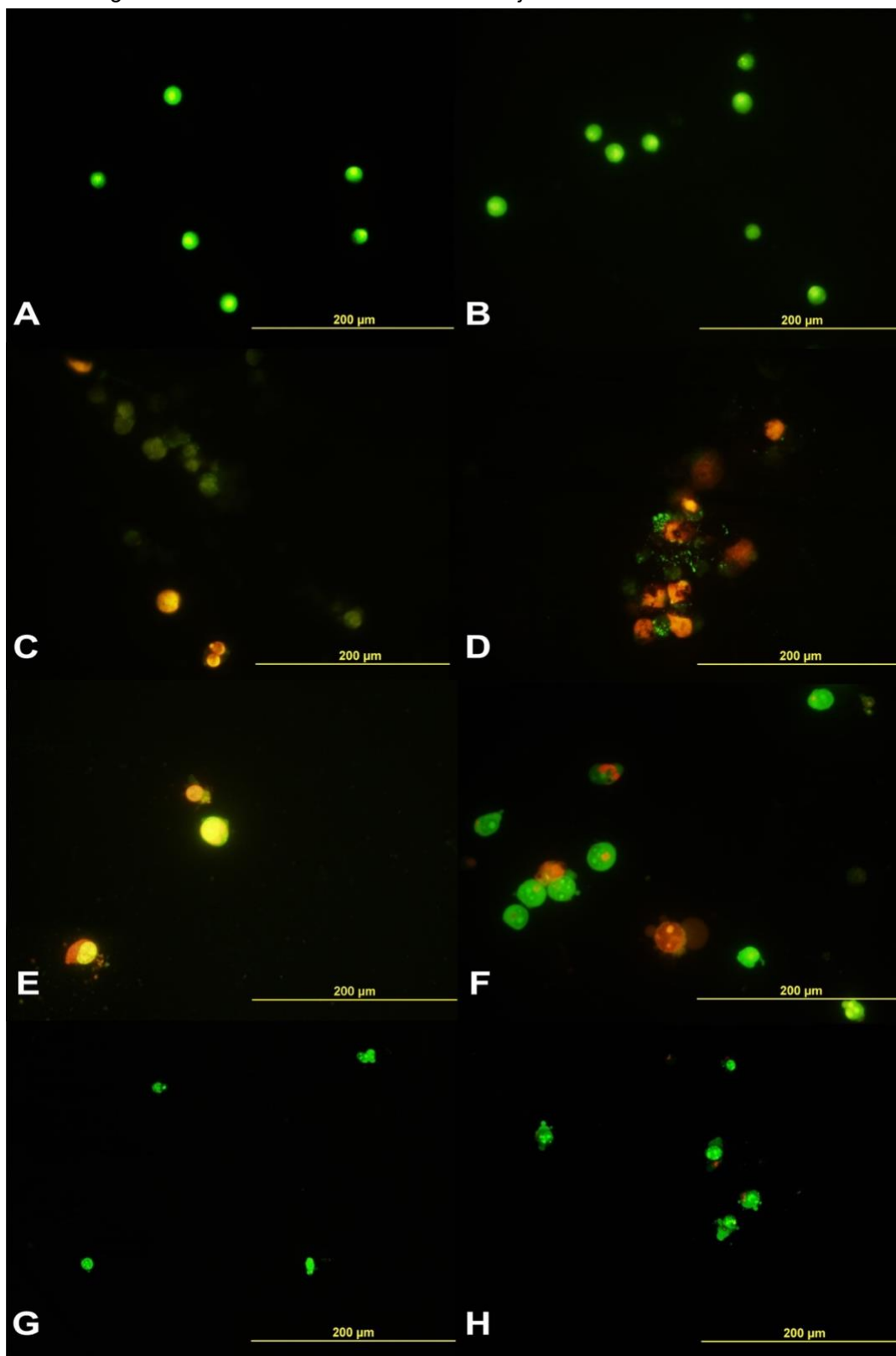
As células do controle se apresentaram normais com coloração verde, membrana íntegra e formato esférico (Figura 13 A e B). As nanopartículas metálicas de prata (Ld Ag NPs) e de ouro (Ld Au NPs) apresentaram células com núcleo alaranjado e uniforme com perda da integridade da membrana, Figuras 13 C e D, respectivamente.

As células submetidas ao tratamento com as nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag MTX PVAL NPs) apresentaram características de corpos apoptóticos, ou seja, apoptose tardia (Figura 13 E). Esta característica pode ser atribuída ao processo rápido de morte celular, reduzindo a viabilidade celular já nas primeiras horas de incubação, confirmando os resultados obtidos durante o ensaio de liberação de LDH.

As nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Au MTX PVAL NPs) e as nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) apresentaram células com característica de apoptose em fase tardia (Figuras 13 F e H). Estas células apresentaram perda da integridade da membrana, com bolhas na membrana, condensação de cromatina e áreas alaranjadas no núcleo.

As nanopartículas de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX B NPs) apresentaram células de tamanho reduzido com bolhas na membrana, núcleo verde e brilhante, com condensação ou fragmentação de cromatina (Figura 13 G).

Figura 13 - Efeito das nanopartículas desenvolvidas com extrato aquoso de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células K562 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio.



Fonte: A autora.

Notas: Aumento de 400x. Controle negativo (A e B), células tratadas por 24 horas com nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) (C) e ouro (Ld Au NPs) (D), nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) (Ld Ag PVAL NPs) (E) e ouro (Ld Au PVAL NPs) (F), de prata vetorizadas com biotina (Ld Ag B NPs) (G) e ouro com biotina (Ld Au B NPs) (H).

Nanopartículas de prata produzidas com extrato de *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. e *Centella asiatica* (L.) Urb. utilizadas em tratamento de células de câncer de próstata e câncer de fígado, levaram a uma indução de morte por apoptose. As células também foram observadas como corpos de cor alaranjada, encolhimento nuclear e formação de bolhas (PRASANNARAJ; VENKATACHALAM, 2017).

Assim como o descrito neste trabalho, em um estudo com células HeLa, as nanopartículas de ouro também induziram apoptose. As células apresentaram núcleos condensados, bolhas na membrana e corpos apoptóticos. Além disso, com o tratamento das nanopartículas de ouro levou as células da linhagem de câncer cervical a um encolhimento celular, condensação e fragmentação nuclear (JEYARAJ *et al.*, 2014).

Quando observado o efeito de nanopartículas de ouro produzidas com extrato de *Abutilon indicum* (L.) Sweet sob células de câncer de cólon, estas, avaliadas por fluorescência, apresentaram corpos apoptóticos com coloração alaranjada e condensação de núcleo indicando um processo de morte por apoptose (MATA; NAKKALA; SADRAS, 2016).

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS 3T3

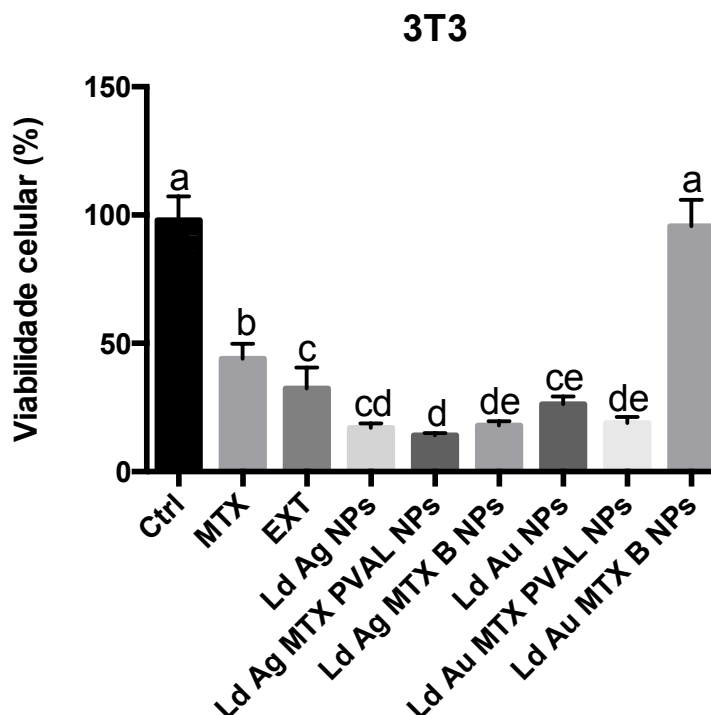
5.5.1 Ensaio de metabolismo celular por redução do MTT em células 3T3

Quando avaliada a viabilidade celular das células 3T3, observou-se que apenas as nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) não conduziram a uma redução na viabilidade celular das células normais estudadas. As demais formulações (Ld Ag NPs, Ld Ag MTX PVAL NPs, Ld Ag MTX B NPs, Ld Au NPs, Ld Au MTX PVAL NPs), o extrato e o metotrexato apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular (Figura 14).

Estes resultados demonstram que as nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) não apresentam um potencial citotóxico quando avaliadas em uma linhagem normal, diferentemente do encontrado para o fármaco comumente empregado no tratamento de leucemias, o metotrexato. Sendo assim, tanto o metotrexato, quanto as demais nanopartículas (Ld Ag NPs, Ld Ag MTX PVAL NPs, Ld Ag MTX B NPs, Ld Au NPs, Ld Au MTX PVAL NPs) parecem não apresentar

característica de seletividade para as células tumorais.

Figura 14 - Viabilidade celular (%) de células 3T3 frente aos diferentes tratamentos.



Fonte: A autora.

Notas: Letras diferentes mostram diferenças estatísticas significativas. Ctrl: controle negativo; MTX: metotrexato; EXT: extrato; Ld Ag NPs: nanopartículas de prata; Ld Ag MTX PVAL NPs: nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Ag MTX B NPs: nanopartículas de prata vetorizadas com biotina; Ld Au NPs: nanopartículas de ouro; Ld Au MTX PVAL NPs: nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Au MTX B NPs: nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina.

Sabe-se que as células tumorais tem atividade metabólica aumentada, proliferação celular extremamente rápida quando comparadas com as células normais, isto significa uma maior resistência das mesmas frente aos tratamentos (KONG *et al.*, 2011). Com os resultados obtidos, pode-se observar que as nanopartículas desenvolvidas com ouro e vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs), apresentaram um grande potencial citotóxico devido ao seu tamanho reduzido, alta citotoxicidade em células leucêmicas e baixa citotoxicidade em células normais, sendo seu índice de seletividade calculado de 2,8, provando ser altamente seletiva às células tumorais.

A citotoxicidade de nanopartículas em células normais pode sofrer variações de acordo com o formato, tamanho, composição química, método de síntese,

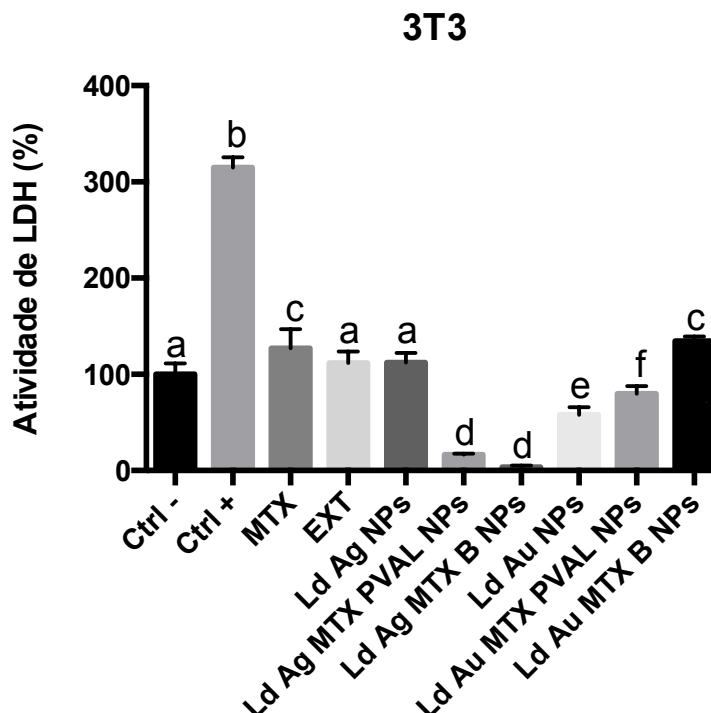
revestimento superficial, funcionalização e solubilidade das nanopartículas (KHAN *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que, dentre as nanopartículas disponíveis, as nanopartículas de ouro se mostram mais seguras e menos tóxicas quando aplicadas ao tratamento do câncer, corroborando os resultados obtidos (KHAN *et al.*, 2014; CONNOR *et al.*, 2005).

5.5.2 Ensaio de integridade de membrana pela liberação da enzima lactato desidrogenase em células 3T3

O resultado da avaliação da liberação da enzima LDH em células 3T3, apresentado na Figura 15, mostrou que o metotrexato e as nanopartículas de ouro conjugadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) apresentaram um pequeno aumento na liberação da LDH de 127,0% e 134,5%, respectivamente, diferindo estatisticamente quando comparado com o controle (100%), porém não diferiram entre si. Enquanto o extrato de *L. dentata* e as nanopartículas de prata (Ld Ag NPs) apresentaram uma liberação de LDH de 111,7% e 112,1%, respectivamente, não apresentando diferença significativa com o controle.

Em um estudo avaliando a toxicidade de nanopartículas de prata sobre células epiteliais mamárias humanas, as nanopartículas produzidas levaram a um aumento da liberação da enzima LDH por rompimento da membrana celular após o tratamento (CASTIGLIONI *et al.*, 2014). Diferente dos resultados encontrados neste trabalho, com a análise de liberação de LDH em células 3T3, pode-se concluir que as nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico) e as vetorizadas com biotina (Ld Ag MTX PVAL NPs e Ld Ag MTX B NPs) levaram a uma morte celular programada do tipo apoptose logo nas primeiras horas de análise, levando a redução na liberação da enzima LDH.

Figura 15 - Porcentagem de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células 3T3 após 24 horas de tratamento.



Fonte: A autora.

Notas: Letras diferentes mostram diferenças estatísticas significativas. Ctrl-: controle negativo; Ctrl+: controle positivo; MTX: metotrexato; EXT: extrato; Ld Ag NPs: nanopartículas de prata; Ld Ag MTX PVAL NPs: nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Ag MTX B NPs: nanopartículas de prata vetorizadas com biotina; Ld Au NPs: nanopartículas de ouro; Ld Au MTX PVAL NPs: nanopartículas de ouro estabilizadas com poli(álcool vinílico); Ld Au MTX B NPs: nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina.

LEE *et al.* (2011) realizaram um estudo de citotoxicidade com nanopartículas de prata em células de pulmão e mostraram, pelo ensaio do MTT, uma alta redução na viabilidade celular destas células normais. Quando avaliada a liberação da enzima LDH, a formulação de nanopartículas apresentou uma alta liberação de LDH de 210% quando comparadas com o controle, indicando um processo necrótico de morte celular. Além disso, apresentaram na análise do ciclo celular uma parada em G2/M o que confirmou o processo de apoptose concomitante se contrapondo, também, aos resultados obtidos neste trabalho. Esta diferença encontrada na análise do ciclo celular, pode estar relacionada com a baixa citotoxicidade das nanopartículas desenvolvidas sobre as linhagens de células normais.

SHANKAR *et al.* (2014) avaliaram a liberação de LDH em células mioblásticas de rato quando tratadas com nanopartículas de prata e ouro isoladas e conjugadas. As nanopartículas que apresentavam os dois metais juntos não apresentaram citotoxicidade diferentemente das nanopartículas de prata. Isso prova

uma maior proteção das nanopartículas de ouro ao dano celular. As nanopartículas não apresentaram liberação de LDH, assim como descrito neste trabalho, o que poderia sugerir uma natureza não-tóxica às nanopartículas.

Outro estudo que pode confirmar os resultados de uma baixa toxicidade em células normais foi o trabalho de Moraes *et al.* (2012), que observaram que nenhum sinal de toxicidade foi induzido em ratos após 24 horas da administração intravenosa de nanopartículas de ouro. Os ratos não apresentaram alterações no comportamento, no tamanho, na cor e na morfologia dos tecidos, nem sinais de inflamação. As injeções foram bem toleradas e não houveram diferenças significativas nos pesos totais tanto dos órgãos quanto dos animais.

Considerando os resultados descritos, observou-se que as nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs) apresentaram características superiores as demais nanopartículas desenvolvidas neste estudo. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde já está bem definido que as nanopartículas de ouro revolucionaram o campo da medicina pela ampla aplicação no campo da vetorização de fármacos, pelas características físicas e químicas inovadoras como tamanho extremamente reduzido, alta superfície de contato, alta estabilidade, baixa toxicidade, entre outras.

As nanopartículas de ouro funcionalizadas com biomoléculas podem ser utilizadas na terapia do câncer com excelentes resultados, levando o fármaco ao sítio específico por diversas vias de administração, minimizando efeitos adversos e aumentando a qualidade de vida do paciente (KHAN *et al.*, 2014). Esta característica é atribuída ao fato das nanopartículas de ouro conseguirem transportar uma grande quantidade de fármaco diretamente às células tumorais e assim levaria a uma redução da toxicidade em células normais (MURAWALA *et al.*, 2014).

Dentre os mecanismos mais descritos para a citotoxicidade das nanopartículas estão: a formação de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, danos nas membranas celulares, nos componentes do citoesqueleto, a mutagênese, a perturbação no transporte intra e intercelular. Podem ainda interferir na divisão celular, na transcrição e no DNA, causar dano nas mitocôndrias alterando seu metabolismo, podem causar alteração no processo de formação de lisossomos e também podem ativar processos inflamatórios (SUKHANOVA *et al.*, 2018).

As vias de administração usuais para nanopartículas são: via intravenosa, intradérmica, subcutânea, inalatória, intraocular, intraperitoneal ou oral (KONG *et al.*, 2011). Sugere-se como aplicação para as nanopartículas desenvolvidas neste estudo, para o tratamento de leucemias, a via intravenosa, uma vez que as nanopartículas estariam em pleno contato com as células para aumentar a interação e disponibilidade com os receptores celulares de membrana. Além disso, a presença do polietilenoglicol na superfície das nanopartículas pode atribuir um tempo maior de exposição para as nanopartículas em circulação sanguínea, permanecendo irreconhecível ao sistema retículo endotelial e promovendo resistência a ligação não específica de macrófagos e proteínas (DURGADAS *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos mostram que após a injeção intravenosa de nanopartículas de ouro a sua distribuição variou conforme o tamanho, onde tamanhos menores apresentaram uma maior difusão, enquanto um tamanho maior foi encontrado no sangue, baço e fígado (JONG *et al.*, 2008). Alguns estudos propõe que as nanopartículas ao entrarem em contato com o organismo, geram uma resposta inflamatória aguda inicial, aumentando a expressão de citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α), que é rapidamente normalizada (LOPEZ-CHAVES *et al.*, 2018).

Quando o processo inflamatório envolvido no processo do câncer não é controlado rapidamente, leva a um aumento de espécies reativas de oxigênio, de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas podem contribuir para complicações como persistência de linfócitos e leucócitos no microambiente celular, possibilitando assim o crescimento de novos tumores e aumentando o desenvolvimento maligno de células cancerosas (CONKLIN, 2000).

O extrato aquoso de *L. dentata* residual, no meio em que se encontram as nanopartículas em suspensão, pode apresentar um possível efeito complementar benéfico nos sistemas nanoparticulados desenvolvidos. Ele pode promover o controle e a minimização dos processos inflamatórios, uma vez que o extrato aquoso mostrou em estudos que pode reduzir a inflamação por ter MMP-9, iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6 e TNF α como possíveis alvos moleculares (LINUS *et al.*, 2017).

6 CONCLUSÃO

Todas as nanopartículas metálicas, tanto as de prata como as de ouro, foram obtidas com sucesso a partir do extrato aquoso de *L. dentata*, comprovando ser um produto natural adequado para a síntese verde. Além disso, o processo de funcionalização, estabilização e vetorização das nanopartículas metálicas produzidas também foi efetivo.

As nanopartículas metálicas obtidas foram altamente eficazes na redução da viabilidade celular das células tumorais. Também foi possível concluir que as nanopartículas metálicas em estudo conduzem as células a um processo de morte celular por apoptose.

O melhor desempenho como agente citotóxico foi apresentado pelas nanopartículas de ouro vetorizadas com biotina (Ld Au MTX B NPs). Esse sistema não foi deletério para as células normais, mas determinou a redução da viabilidade das células leucêmicas testadas, mostrando-se, desta forma, altamente seletivas com índice de seletividade calculado de 2,8, comprovando a importância da vetorização dos sistemas nanoparticulados.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20-26, 2013.
- BAC, L. H.; GU, W. H.; KIM, J. C.; KIM, B. K.; KIM, J. S. Characterization and stability of silver nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Korean Powder Metallurgy Institute**, v. 19, p. 55-59, 2012.
- BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO, L. M.; GOODMAN, C. B. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993-2996, 2009.
- BAGHERZADE, G.; TAVAKOLI, M. M.; NAMAEL, M. H. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 227, 2017.
- BERTINO, J. R.; GÖKER, E.; GORLICK, R.; LI, W. W.; BANERJEE, D. Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. **The Oncologist**, v. 1, p. 223-226, 1996.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CASTIGLIONI, S.; CASPANI, C.; CAZZANIGA, A.; MAIER, J. A. Short- and long-term effects of silver nanoparticles on human microvascular endothelial cells. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 457-464, 2014.
- CHAN, F. K.; MORIWAKI, K.; ROSA, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 979, p. 65-70, 2013.
- CHEN, S.; ZHAO, X.; CHEN, J.; CHEN, J.; KUZNETSOVA, L.; WONG, S. S.; OJIMA, I. Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, p. 979-987, 2010.
- CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. **Nano Letters**, v. 6, p. 662-668, 2006.
- CONKLIN, K. A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutrition and Cancer**, v. 37, n. 1, p. 1-18, 2000.

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**, v. 1, n. 3, p. 325-327, 2005.

COSTA, P.; GONÇALVES, S.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M.; ROMANO, A. Metabolic profile and biological activities of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco: studies on the essential oil and polar extracts. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2501-2506, 2013.

DEVATHA, C. P.; THALLA, A. K. Green Synthesis of Nanomaterials. **Synthesis of Inorganic Nanomaterials**, p. 169-184, 2018.

DIAS, F. D. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Determination of Phenolic Acids and Quercetin in Brazilian Red Wines from Vale do São Francisco Region Using Liquid-Liquid Ultrasound-Assisted Extraction and HPLC-DAD-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, 2016.

DOOREN-GREEBE, R. V.; KUIJPERS, A.; MULDER, J.; BOO, T. D.; KERKHOF, P. V. D. Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 204-210, 1994.

DURGADAS, C. V.; SHARMA, C. P.; PAUL, W.; REKHA, M. R.; SREENIVASAN, K. Aggregation of gold nanoparticles followed by methotrexate release enables Raman imaging of drug delivery into cancer cells. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 14, p. 1127, 2012.

ELEMIKE, E. E.; ONWUDIWE, D. C.; EKENNIA, A. C.; KATATA-SERU, L. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial effect of silver nanoparticles obtained using *Lavandula x intermedia*. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, p. 1383–1394, 2017.

GAO, Z.; KANG, X.; HU, J.; JU, Y.; XU, C. Induction of apoptosis with mitochondrial membrane depolarization by a glycyrrhetic acid derivative in human leukemia K562 cells. **Cytotechnology**, v. 64, p. 421-428, 2012.

GRIM, J.; CHLÁDEK, J.; MARTÍNKOVÁ, J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Non-Neoplastic Diseases. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 139-151, 2003.

HAISS, W.; THANH, N. T. K.; AVEYARD, J.; FERNIG, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 4215-4221, 2007.

HOLMBOE, L.; ANDERSEN, A. M.; MØRKRID, L.; SLØRDAL, L.; HALL, K. S. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 106-114, 2011.

HUSSAIN, S. M.; HESS, K. L.; GEARHART, J. M.; GEISS, K. T.; SCHLAGER, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 975-983, 2005.

IQBAL, P.; PREECE, J. A.; MENDES, P. M. Nanotechnology: The "Top-Down" and "Bottom-Up" Approaches. **Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials**, 2012.

JEYARAJ, M.; ARUN, R.; SATHISHKUMAR, G.; MUBARAKALI, D.; RAJESH, M.; SIVANANDHAN, G.; KAPILDEV, G.; MANICKAVASAGAM, M.; THAJUDDIN, N.; GANAPATHI, A. An evidence on G2/M arrest, DNA damage and caspase mediated apoptotic effect of biosynthesized gold nanoparticles on human cervical carcinoma cells (HeLa) **Materials Research Bulletin**, v. 52, p. 15-24, 2014.

JIA, Y.-P.; MA, B.-Y.; WEI, X.-W.; QIAN, Z.-Y. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, p. 691-702, 2017.

JONG, W. H. D.; HAGENS, W. I.; KRYSTEK, P.; BURGER, M. C.; SIPS, A. J. A. M.; GEERTSMA, R. E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, p. 1912-1919, 2008.

JUNIOR, M. A. M.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química nova**, v. 35, n. 9, 2012.

JÚNIOR, R. F. D. A.; ARAÚJO, A. A. D.; PESSOA, J. B.; NETO, F. P. F.; SILVA, G. R. D.; OLIVEIRA, A. L. C. S. L.; CARVALHO, T. G. D.; SILVA, H. F. O.; EUGÊNIO, M.; SANT'ANNA, C.; GASPAROTTO, L. H. S. Anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor properties of gold nanoparticles. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 119-129, 2017.

KHAN, A.; RASHID, R.; MURTAZA, G.; ZAHRA, A. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 1169-1177, 2014.

KIM, J. A.; ÅBERG, C.; SALVATI, A.; DAWSON, K. A. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 7, p. 62-70, 2011.

KONG, B.; SEO, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929-941, 2011.

KUMAR, B.; SMITA, K.; VIZUETE, K. S. A.; CUMBAL, L. Aqueous Phase Lavender Leaf Mediated Green Synthesis of Gold Nanoparticles and Evaluation of its Antioxidant Activity. **Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 1-4, 2016.

KUMAR, G. A.; NAIK, H. S. B.; VISWANATH, R.; GOWDA, I. K. S.; SANTHOSH, K. N. Tunable emission property of biotin capped Gd:ZnS nanoparticles and their antibacterial activity. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 58, p. 22-29, 2017.

LEE, K. S.; EL-SAYED, M. A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 39, p. 19220-5, 2006.

LEE, Y. S.; KIM, D. W.; LEE, Y. H.; OH, J. H.; YOON, S.; CHOI, M. S.; LEE, S. K.; KIM, J. W.; LEE, K.; SONG, C.-W. Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC δ -dependent signaling in A549 lung cells. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 1529-1540, 2011.

LINUS, L. O.; HANSON, C.; ALOLGA, R. N.; ZHOU, W.; QI, L. Targeting the key factors of inflammation in cancer: plant intervention. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 10, n. 12, p. 15834-15865, 2017.

LOPEZ-CHAVES, C.; SOTO-ALVAREDO, J.; MONTES-BAYON, M.; BETTMER, J. R.; LLOPIS, J.; SANCHEZ-GONZALEZ, C. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, p. 1-12, 2018.

MAHMOUDI, M.; AZADMANESH, K.; SHOKRGOZAR, M. A.; JOURNEYAY, W. S.; LAURENT||, S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 3407-3432, 2011.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

MATA, R.; NAKKALA, J. R.; SADRAS, S. R. Polyphenol stabilized colloidal gold nanoparticles from *Abutilon indicum* leaf extract induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 499-510, 2016.

MATSUSHITA, A. F. Y.; INABA, J.; FUJIWARA, S. T.; WOHNATH, K.; GARCIA, J. R.; PESSOA, C. A. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in the polymer 3-N-propyl pyridine silsesquioxane chloride for application in textile materials. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 18, n. 1, p. 39-50, 2012.

MONSHI, A.; FOROUGHI, M. R.; MONSHI, M. R. M. Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 2, n. 154, 2012.

MORAIS, T.; SOARES, M. E.; DUARTE, J. A.; SOARES, L.; MAIA, S.; GOMES, P.; PEREIRA, E.; FRAGA, S.; CARMO, H.; BASTOS, M. D. L. Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 185-193, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, Z.; RAZA, A.; GHAFOR, S.; NAEEM, A.; NAZ, S. S.; RIAZ, S.; AHMED, W.; RANA, N. F. PEG capped methotrexate silver nanoparticles for efficient anticancer activity and biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 251–255, 2016.

MURAWALA, P.; TIRMALE, A.; SHIRAS, A.; PRASAD, B. L. V. In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: Effective carrier of anticancer drug Methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 34, p. 158–167, 2014.

NEJAD, M. S.; BONJAR, G. H. S.; KHALEGHI, N. Biosynthesis of gold nanoparticles using streptomyces fulvissimus isolate. **Nanomedicine Journal**, v. 2, n. 153, 2015.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens. **Comunicado Técnico**, v. 99, 2008.

NIU, L.; LUO, Y.; LI, Z. Highly Selective Chemical Gas Sensor Based on Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes with Poly(ethylene Glycol). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 126, p. 361, 2007.

PATRA, S.; MUKHERJEE, S.; BARUI, A. K.; GANGULY, A.; SREEDHAR, B.; PATRA, C. R. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 298–309, 2015.

PHILIP, D. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 2, p. 374–81, 2009.

POLTE, J. R. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. **CrystEngComm**, v. 17, p. 6809–6830, 2015.

PORT'S, P. D. S.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875–881, 2013.

PRASANNARAJ, G.; VENKATACHALAM, P. Green engineering of biomolecule-coated metallic silver nanoparticles and their potential cytotoxic activity against cancer cell lines. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, 2017.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. 12, 2005.

RIZK, N.; CHRISTOFOROU, N.; LEE, S. Optimization of anti-cancer drugs and a targeting molecule on multifunctional gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 27, p. 1–8, 2016.

ROSARIN, F. S.; ARULMOZHI, V.; NAGARAJAN, S.; MIRUNALINI, S. Antiproliferative effect of silver nanoparticles synthesized using amla on Hep2 cell line. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 1-10, 2012.

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 764, p. 217-254, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHANKAR, S.; JAISWAL, L.; APARNA, R. S. L.; PRASAD, R. G. S. V. Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility, and antimicrobial activity of gold, silver and gold silver alloy nanoparticles prepared from Lansium domesticum fruit peel extract. **Materials Letters**, v. 137, p. 75-58, 2014.

SHANKAR, S. S.; RAI, A.; ANKAMWAR, B.; SINGH, A.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. **Nature Materials**, v. 3, n. 7, p. 482-8, 2004.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83-96, 2009.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 5th. New York: 1991.

SUDHAMANI, S. R.; PRASAD, M. S.; SANKAR, U. K. DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blends films. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 3, p. 245-250, 2003.

SUKHANOVA, A.; BOZROVA, S.; SOKOLOV, P.; BERESTOVOY, M.; KARAULOV, A.; NABIEV, I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 44, p. 13-44, 2018.

TRAN, N. T. T.; WANG, T.-H.; LIN, C.-Y.; TAI, Y. Synthesis of methotrexate-conjugated gold nanoparticles with enhanced cancer therapeutic effect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 175-180, 2013.

UDDIN, M. J.; CHAUDHURI, B.; PRAMANIK, K.; MIDDYA, T. R.; CHAUDHURI, B. Black tea leaf extract derived Ag nanoparticle-PVA composite film: Structural and dielectric properties. **Materials Science and Engineering B**, v. 177, p. 1741-1747, 2012.

UPSON, T. M.; GRAYER, R. J.; GREENHAM, J. R.; WILLIAMS, C. A.; AL-GHAMDI, F.; CHEN, F.-H. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 991-1007, 2000.

WOSIKOWSKI, K.; BIEDERMANN, E.; RATTEL, B.; BREITER, N.; JANK, P.; LÖSER, R.; JANSEN, G.; PETERS, G. In vitro and in vivo antitumor activity of methotrexate conjugated to human serum albumin in human cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1917-1926, 2003.

YAMAUCHI, A.; ICHIMIYA, T.; INOUE, K.; TAGUCHI, Y.; MATSUNAGA, N.; KOYANAGI, S.; FUKAGAWA, T.; ARAMAKI, H.; HIGUCHI, S.; OHDO, S. Cell-Cycle-Dependent Pharmacology of Methotrexate in HL-60. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 335-341, 2005.

YANG, W.; CHENG, Y.; XU, T.; WANG, X.; WEN, L.-P. Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 862-868, 2009.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Leaf trichomes of Portuguese *Lavandula* species: a comparative morphological study. **Microscopy and Microanalysis**, v. 15, n. 3, 2009.