

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia

LAÍS DE SOUZA VIEIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES
NANOESTRUTURADOS DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA TERAPIA
FOTODINÂMICA**

São José dos Campos, SP.

2015

LAÍS DE SOUZA VIEIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES
NANOESTRUTURADOS DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA TERAPIA
FOTODINÂMICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Física e Astronomia.

Orientador: Leandro José Raniero.

São José dos Campos, SP.

2015

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Vieira, Laís de Souza
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES
NANOESTRUTURADOS DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA /
Laís de Souza Vieira; orientador, Leandro J. Raniero. - São José
dos Campos, SP, 2015.
1 CD-ROM, 102 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Física
e Astronomia.

Inclui referências

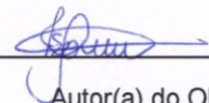
1. Física e Astronomia. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Terapia
Fotodinâmica. 4. Espectroscopia por UV-visível. 5. Espectroscopia
no Infravermelho com transformada de Fourier. I. Raniero,
Leandro J., orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa
de Pós-Graduação em Física e Astronomia. III. Título.

Eu, Laís de Souza Vieira, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 18 de Março de 2015.



Autor(a) do Obra

Data da defesa: 26 / 02 / 15

*Dedico esta dissertação ao amor incondicional e ao
incentivo incansável de Solange Maria de Souza,
mãezinha querida, inspiradora e meu refúgio eterno.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo milagre da vida e por seu imenso amor, que me proporcionou calma e conforto nos momentos difíceis e paz nos momentos felizes.

Ao Prof. Leandro Raniero que além de me orientar, também exerceu o papel de amigo, muitas vezes de pai, me desculpe, mas é mesmo, e principalmente de psicólogo (pausa para os risos!). Gostaria de agradecer pela confiança e por todos os ensinamentos, sejam eles da pesquisa científica mas também de muitos se tratando de relacionamentos e sobre meu comportamento. Um dia espero saber só um pouquinho do que você sabe sobre tuuudo! Obrigada por todos estes anos de conversas, conselhos, puxões de orelha, artigos para discutir, cafês, mesmo eu não gostando de café, chocolates trocados e quilinhos a mais por isso. Sempre lembrarei de você com muito carinho, principalmente quando precisar ajuda, pode ter certeza que vou te ligar!

Aos Professores Doutores do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento pela colaboração em todas minhas atividades e experimentos, sempre se mostrando dispostos, em especial: Ana Maria do Espírito Santo, Cláudio C. Tellez Soto, Maria Angélica Gargione e Josanne Mittman.

Ao Prof. Dr. Liu Yao Cho, pela disponibilidade, conselhos e treinamento para a utilização da câmara de Luvas. Agradeço desde o primeiro dia de aula da graduação em que sempre me mostrou o “lado químico da coisa”.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Oliveira, pelas imagens de microscopia de fluorescência realizadas na Universidade de Campinas e discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Kevin Hewitt, pela colaboração e pelas micrografias de MET realizadas na Universidade Dalhousie, no Canadá.

A Profa. Dra. Maricilia Silva Costa, pela disponibilidade e dedicação e por sempre deixar disponível o seu laboratório.

A Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino, pela disponibilidade do laboratório de terapia fotodinâmica.

A aluna de doutorado Juliana Guerra, por todo suporte na área biológica, que sinceramente, foi a parte mais difícil a ser realizada, obrigada Ju.

As amigas Rani Alves, Jaciara Fagundes e Larissa, pelo companheirismo, carinho e amizade. Aos companheiros de laboratório Guilherme, Nathanne, Paulo, Josafá, Lia, Isabelle, Maiara e Valéria Maeda pelos momentos de descontração e discussão de vários assuntos.

A minha família, principalmente aos meus avós pelo carinho e pela força mesmo estando longe.

As amigas de longa data, que se mostram presentes apesar da distância. Talita, Adriene e Tchandra, obrigada pelo carinho e apoio, sem vocês eu não conseguiria.

Aos funcionários do IP&D pelo trabalho e dedicação em manter o ambiente de trabalho sempre acolhedor e transformá-lo em minha segunda casa, em especial aos funcionários “tião” e Edilson pelo carinho e pelo incentivo lá pelas tantas horas da noite rsrs.

Ao Matias Freitas Lemes, pelo apoio, todos estes anos, se mostrando sempre presente nos momentos mais difíceis e compartilhando comigo minhas alegrias.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES NANOESTRUTURADOS DE TERCEIRA GERAÇÃO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

A terceira geração de fotossensibilizadores (FS) potencializa a terapia fotodinâmica (TFD) em relação aos da segunda geração, pois aumenta a sua seletividade e eficiência. A TFD é alternativa no tratamento do câncer com base na interação do FS, comprimento de onda específico e oxigênio molecular. O FS é absorvido pelas células e, em seguida, a região é iluminada gerando reações em cascata que resultam em morte celular. A clorina e6 (Ce6) foi modificada quimicamente por uma molécula de tiouréia por meio da química carbodimida, a fim de aumentar sua afinidade às nanopartículas de ouro (AuNps). A região de absorção da Ce6 entre 650 nm a 680 nm, é ideal para aplicação biológica devido ao baixo coeficiente de absorção de tecido biológico, conhecida como janela terapêutica. As AuNps com diâmetro médio de 22 nm, foram escolhidas pois apresentam uma boa biocompatibilidade. As caracterizações das nanoestruturas foram feitas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia no UV-visível (UV-vis), Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e por potencial Zeta. A eficiência deste novo fotossensibilizador foi testada em uma linhagem de células de carcinoma da mama humano (ATCC MD- MB 468). A viabilidade celular e a atividade mitocondrial foram medidas por ensaios colorimétricos e de colorimetria, que mostraram que o FS nanoestruturado não apresenta citotoxicidade quando não irradiado e que a presença das AuNps potencializam o efeito da Ce6. A síntese de um novo FS ligado a AuNps aumentou o efeito da droga administrada, utilizando doses menores quando comparadas a Ce6. Este fato indica que este novo FS pode ser amplamente utilizado em TFD.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Clorina e6. Câncer de mama. Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THIRD GENERATION OF NANOSTRUCTURED PHOTSENSITIZER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY

The third generation of photosensitizers (PS) enhances photodynamic therapy (PDT) compared to the second generation, as it increases selectivity and efficiency. PDT is an alternative treatment for cancer based on the interaction of the PS, specific wavelength and molecular oxygen. The PS is absorbed by cells, and then the region is illuminated generating a cascade of reactions that result in cell death. The chlorin e6 (Ce6) was chemically modified by a thiourea molecule through chemical carbodimide, in order to increase their affinity to gold nanoparticles (AuNPs). The region of absorption of Ce6 is between 650 nm to 680 nm, that is ideal for biological application due to the low coefficient of biological tissue absorption, known as therapeutic window. The AuNPs with an average diameter of 22 nm were selected because they have good biocompatibility. The characterization of nanostructures were performed by Transmission Electron Microscopy (TEM), UV-visible spectroscopy (UV-vis), Infrared Spectroscopy Fourier transform (FT-IR), dynamic light scattering (DLS) and Zeta potential . The efficiency test of this new photosensitizer was performed in a line of human breast carcinoma cells (ATCC MD-MB 468). Cell viability and mitochondrial activity are measured by colorimetric assays and colorimetry, which showed that the PS nanostructured is not cytotoxic when non-irradiated in the presence of AuNPs potentiate the CE6. The synthesis of a new FS connected to AuNPs increased the effect of the drug administered using smaller doses as compared to Ce6. This indicates that this new PS can be widely used in PDT.

Key-Words: Photodynamic Therapy, Breast Cancer. Chlorin e6. Gold Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: ESCALA COMPARATIVA DE ESTRUTURAS FÍSICAS, BIOLÓGICAS E ORGANISMOS UNICELULARES.	21
FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA RPSL EM NPS METÁLICAS.....	22
FIGURA 3: ESCALA DE CORES COMPLEMENTARES.	23
FIGURA 4: MICROGRAFIAS POR MET E DE MEV DE AuNPs.	24
FIGURA 5: ESTIMATIVA E PROJEÇÃO DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS ENTRE O PERÍODO DE 2008-2014 E OS PRÓXIMOS ANOS.	26
FIGURA 6: AuNPs ESTABILIZADAS POR $C_6H_5NA_3O_7$	28
FIGURA 7: ESQUEMA DE PRESSÃO VERSUS H, PARA TEORIA DLVO.	30
FIGURA 8: ESTRUTURA QUÍMICA DA TIOURÉIA.	32
FIGURA 9: ESQUEMA REPRESENTANDO A TFD.	34
FIGURA 10: ILUSTRAÇÃO REPRESENTANDO OS ESTADOS A) FUNDAMENTAL, B) EXCITADO SINGLETTO E C) TRIPLETTO.....	35
FIGURA 11: DIAGRAMA DE JABLONSKI.	36
FIGURA 12: ABSORÇÃO DE HEMOGLOBINA, OXIHEMOGLOBINA E ÁGUA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA AO IR PRÓXIMO.	38
FIGURA 13: ESTRUTURA QUÍMICA DA Ce6.	40
FIGURA 14: ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO.	42
FIGURA 15: ESPECTRÔMETRO DE UV-VIS DENOVI (ESQUERDA) E PEDESTAL DA AMOSTRA (DIREITA).	45
FIGURA 16: TIPOS DAS VIBRAÇÕES MOLECULARES.	47
FIGURA 17: ACESSÓRIO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA.....	48
FIGURA 18: A) ESPECTRÔMETRO FT-IR SPECTRUM 400 E B) ACESSÓRIO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR).	49
FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DA DUPLA CAMADA ELÉTRICA QUE ENVOLVEM AS NPS.	50
FIGURA 20: ESQUEMA DAS INTERAÇÕES ENTRE NPS.	52
FIGURA 21: SÍNTESE DE AuNPs: A) SOLUÇÃO DE CLORETO DE OURO; B) ADIÇÃO DE $C_6H_5NA_3O_7$; C) INÍCIO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO; E, D) SOLUÇÃO COLOIDAL DE OURO.....	54
FIGURA 22: ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA SINTETIZADA.	56
FIGURA 23: EQUIPAMENTO LIGHT-IRRAD LED5 - 660 (BIOPADI).....	59
FIGURA 24: PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	60
FIGURA 25: ESPECTRO DE UV-VISÍVEL DAS AuNPs.	62
FIGURA 26: MICROGRAFIAS POR MET DE AuNPs.....	63
FIGURA 27: GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS AuNPs OBTIDAS POR MET.	63
FIGURA 28: INTENSIDADE DAS DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHO DE AuNPs OBTIDAS POR DLS.	64
FIGURA 29: POTENCIAL ZETA DAS AMOSTRAS DE AuNPs EM TRIPLICATA E A MÉDIA.	65
FIGURA 30: ESPECTRO DE UV-VIS DA Ce6.	66
FIGURA 31: ESPECTRO DE UV-VIS DAS DILUIÇÕES DA SOLUÇÃO DE Ce6.	67
FIGURA 32: GRÁFICO DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO VERSUS ABSORÇÃO.	67
FIGURA 33: ETAPAS DA REAÇÃO ENTRE A Ce6 E A TIOURÉIA.	68

FIGURA 34: REAÇÃO CARBODIIMIDA ENTRE A CE6 E A TIOURÉIA.	68
FIGURA 35: ESPECTRO DE FT-IR DAS AMOSTRAS DE CE6-TIOURÉIA.	69
FIGURA 36: ESPECTRO DE UV-VIS DA AMOSTRA DE CE6-AUNPS.	70
FIGURA 37: ESPECTRO DE FT-IR DAS AMOSTRAS DE CE6-TIOURÉIA E A MISTURA DOS REAGENTES.	71
FIGURA 38: INTENSIDADE DAS DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHO DE CE6-AUNPS.	72
FIGURA 39: POTENCIAL ZETA DAS AMOSTRAS DE CE6-AUNPS EM TRIPLICATA.	73
FIGURA 40: IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS MDA-MB 468. A) GRUPO I B) GRUPO II E C) GRUPO III.	74
FIGURA 41: ENSAIO POR MTT DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CE6.	76
FIGURA 42: RELAÇÃO ENTRE OS GRUPOS IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS DO TESTE POR MTT.	77
FIGURA 43: ENSAIO POR AZUL DE TRIPAN DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CE6.	78
FIGURA 44: TESTE COLORIMÉTRICO MTT.	79
FIGURA 45: TESTE DE COLORAÇÃO POR AZUL DE TRIPAN.	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PROPORÇÃO ENTRE OS REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO CARBODIIMIDA.....	55
TABELA 2: COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DO DIÂMETRO PELAS TÉCNICAS DE MET E DLS.	64
TABELA 3: DADOS OBTIDOS PELO POTENCIAL ZETA DAS AUNPs.	65
TABELA 4: TABELA DE ATRIBUIÇÃO DOS MODOS VIBRACIONAIS.	71
TABELA 5: DADOS OBTIDOS PELO POTENCIAL ZETA DAS CE6-AUNPs.....	73
TABELA 6: RELAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E O TEMPO DE INCUBAÇÃO.	74
TABELA 7: INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS INCUBADAS COM A CE6 POR 2, 4 E 8 HORAS, OBTIDAS PELA DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DO BRILHO DOS PIXELS	75

ABREVIATURA E SIGLAS

<i>A.C.</i>	<i>Antes de Cristo</i>
<i>Abs</i>	<i>Absorção</i>
<i>ATCC</i>	<i>American type Culture Collection</i>
<i>ATPP</i>	
<i>ATR</i>	<i>Reflexão Total Atenuada, do inglês (Attenuated Total Reflectance)</i>
<i>AuNps</i>	<i>Nanopartículas de ouro</i>
<i>Azul de Tripán</i>	<i>1,1'-(bifenil-4,4'-diil) bis(azo)bis [5-amino-4-hidroxinaftaleno-2,7-disulfonato</i>
<i>Ce6</i>	<i>Clorina e6</i>
<i>Ce6-AuNps</i>	<i>Clorina e6 funcionalizada à Nanopartículas de ouro</i>
<i>Ce6-tiouréia</i>	<i>Clorina e6 modificadas por tiouréia</i>
<i>DAPI</i>	<i>4',6' - diamidino-2-fenilindole</i>
<i>DCC</i>	<i>N, N' -diciclohexilcarbodiimida</i>
<i>DLS</i>	<i>Espalhamento dinâmico de luz, do inglês (Dynamic Light Scattering,)</i>
<i>DLVO</i>	<i>Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<i>EDC</i>	<i>1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida</i>
<i>EROS</i>	<i>Espécies Reativas de Oxigênio</i>
<i>FS</i>	<i>Fotossensibilizador</i>
<i>FT-IR</i>	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês (Fourier transform infrared spectroscopy)</i>
<i>HpD</i>	<i>Hematoporfirina</i>
<i>INCA</i>	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
<i>IR</i>	<i>Infravermelho</i>
<i>ISI</i>	<i>Instituto para formação Científica, do inglês (Institute for Scientific Information)</i>
<i>MET</i>	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>
<i>MEV</i>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>
<i>MTT</i>	<i>Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio</i>
<i>NHS</i>	<i>N-hidroxi-succinimida</i>
<i>Nps</i>	<i>Nanopartículas</i>

<i>PBS</i>	<i>Solução tampão de fosfato, do inglês (Phosphate Buffer Solution)</i>
<i>PenStrep</i>	<i>Penicilina e Estreptomicina</i>
<i>RPSL</i>	<i>Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada</i>
<i>SBF</i>	<i>Soro Fetal Bovino</i>
<i>SRE</i>	<i>Sistema Reticulo Endotelial</i>
<i>SERS</i>	<i>Espectroscopia Raman de Superfície, do inglês (Surface-enhanced Raman Spectroscopy)</i>
<i>Sulfo-NHS</i>	<i>N-hidroxisulfosuccinimida</i>
<i>TFD</i>	<i>Terapia Fotodinâmica</i>
<i>UV-vis</i>	<i>Faixa espectral do ultravioleta ao visível</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Objetivos.....	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1.	As Nanopartículas de ouro	21
2.2.	Síntese das Nanopartículas de ouro	27
2.3.	A Teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek.....	28
2.4.	Aplicação Biológica	31
2.5.	Toxicidade das Nanopartículas de ouro.....	32
2.6.	A Terapia Fotodinâmica	33
2.7.	Processos Fotoquímicos da Terapia Fotodinâmica	35
2.8.	O Fotossensibilizador	37
2.8.1.	Clorina e6	39
2.9.	A química carbodiimida	40
2.10.	Técnicas de Caracterização	41
2.10.1.	Espectroscopia por UV-visível.....	42
2.10.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
2.10.3.	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier.....	46
2.10.4.	Potencial Zeta	49
2.10.5.	Espalhamento Dinâmico de Luz.....	50
2.10.6.	Microscopia de Fluorescência	52
3.	METODOLOGIA	54
3.1.	Síntese de Nanopartículas de ouro	54
3.2.	Clorina e6	54
3.3.	Tiouréia.....	55
3.4.	Funcionalização da Clorina e6 à Tiouréia	55
3.5.	Funcionalização à Nanopartículas de ouro	56
3.6.	Análise por UV-visível.....	56
3.7.	Análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	57
3.8.	Análise de FT-IR	57
3.9.	Cultura de Células	57
3.9.1.	A Terapia Fotodinâmica	59
3.9.2.	Ensaio por Microscopia de Fluorescência	59
3.9.3.	Ensaio de Viabilidade Celular	60

4.	RESULTADOS.....	62
4.1.	As Nanopartículas de ouro	62
4.2.	Clorina e6	66
4.3.	Funcionalização da Clorina e6 à Tiouréia	68
4.4.	Funcionalização às AuNps	69
4.5.	Ensaio de Fluorescência.....	73
4.6.	Ensaio de Viabilidade Celular	75
5.	DISCUSSÃO.....	81
5.1.	As Nanopartículas de ouro	81
5.2.	Clorina e6	84
5.3.	Funcionalização da Clorina e6 a Nanopartículas de ouro.	85
5.4.	Ensaio de Fluorescência e de Citotoxicidade.....	88
6.	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1.INTRODUÇÃO

O crescimento e proliferação de células tumorais malignas ocorrem por meio de mutações gênicas que causam alterações fundamentais das vias que regulam os processos de diferenciação celular, proliferação, sobrevivência e mobilidade. (NICHOLSON, 2001) Dentre os tipos de câncer, o de mama é mundialmente o mais comum entre mulheres e a segunda maior causa de mortalidade. (BYDOUN ,2014) No Brasil, excluindo os casos de tumores malignos cutâneos, os casos de câncer de mama são prevalentes em todos os estados, pois há falta de um acompanhamento médico adequado e exames preventivos regulares. (GLOBOCAN, 2012) A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) de novos casos foi de 57.120, para o ano de 2014. (INCA, 2014).

Os principais fatores de risco relacionados ao câncer de mama são o avanço da idade, aspectos endócrinos, genéticos e ambientais. (ADAMI, 2008) Outros fatores incluem a exposição a radiações ionizantes, a ingestão contínua de bebidas alcoólicas, a obesidade, o tabagismo e o sedentarismo. (INCA, 2007; SAGHATCHIAN, 2014) Por outro lado, a prática de atividades físicas regulares e o aleitamento materno podem ser considerados fatores protetores. (ADAMI, 2008, INCA, 2007) De modo geral, a doença se instala pela combinação destes fatores, mas ainda não existe um consenso sobre os mecanismos iniciadores desta doença. (ADAMI, 2008; SAGHATCHIAN, 2014; INCA, 2007)

Os tratamentos padrões deste tipo de câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Estes tratamentos podem ser indicados de forma isolada ou concomitantes, dependendo do estágio da doença. Entretanto, a quimioterapia e a radioterapia têm efeitos colaterais severos, que levam o paciente a debilidade. Os efeitos colaterais após a quimioterapia incluem náuseas, vômitos, astenia e mucosite, que podem ser intensificados quando combinados com procedimentos cirúrgicos e radioterapia. Os estudos de casos clínicos também relatam comportamento depressivo e distúrbios do sono, que podem estar relacionados a falta de perspectiva de cura. (HENDERSON; 1992) Para além destes efeitos, o tecido celular tratado modifica-se em função da agressão causada pela radiação ionizante e/ou pelo quimioterápico, assim o efeito cumulativo limita o tratamento a uma dose máxima permitida.

A necessidade de novos tratamentos, que reduzam os efeitos colaterais e melhorem a qualidade de vida destes pacientes, motivam a comunidade científica a buscar alternativas. Dentre elas, a Terapia Fotodinâmica (TFD) é bastante promissora, pois não tem efeito cumulativo. (JOSEFSEN, 2008) Esta terapia, baseia-se na administração intravenosa de um

fotossensibilizador (FS) e a irradiação seletiva da região corporal a ser tratada. A interação da radiação com o FS produz espécies reativas de oxigênio (EROS), que desencadeiam uma cascata de eventos responsável pela morte celular. (BONNET 1995; HENDERSON 1992) Clinicamente, a TFD utiliza o efeito fotodinâmico para causar a destruição seletiva de tecidos cancerosos. Este efeito engloba processos físicos, químicos e biológicos, que permite a restauração do tecido e gera menos efeitos colaterais, quando comparada aos métodos convencionais. (MACHADO 2000; ROCO 2002)

Nos últimos anos, alguns estudos buscaram melhorar as propriedades químicas dos FS e sua interação *in vivo*, para aumentar a eficiência da TFD. Os FS mais utilizados são as porfirinas e seus análogos. As clorinas são derivadas das porfirinas por meio da saturação de seu anel pirrólico, sendo considerada a segunda geração dos FS. Esta alteração gera uma mudança significativa no espectro de absorção do FS na região do infravermelho (IR). (CALVETE, 2009; RESHETNICKOV, 2000)

A nanotecnologia também tem sido utilizada para melhorar as propriedades químicas dos FS. Nanopartículas (Nps) com diversas geometrias e materiais, principalmente metais nobres, são utilizadas como nanossensores. O grande potencial de aplicação, abrange o diagnóstico preciso e o tratamento do câncer. (ALKILANY, 2010; KUMAR, 2005) No entanto, existem algumas barreiras para a aplicação *in vivo*, tais como, a biocompatibilidade, a cinética *in vivo*, a toxicidade aguda e crônica, a capacidade de ser expelido do sistema retículo-endotelial (SRE), e o custo benefício. (JAIN, 2007)

Entre as Nps metálicas, as nanopartículas de ouro (AuNps) possuem inércia química e baixa toxicidade, que permitem uma aplicação diversificada, tais como, nos ensaios *in vitro*, nas terapias contra o câncer, imageamento *in vitro* e *in vivo*, e carreador de drogas. (BIJU, 2013) O crescimento destas estruturas é governado pela polaridade e a reatividade da superfície das AuNps. Neste caso é essencial a escolha de uma molécula com afinidade química que mantenha a estabilidade coloidal. (ZENG, 2011) Alguns grupos funcionais, como tiol, amina e ciano, possuem alta afinidade química por AuNps, permitindo a funcionalização de biomoléculas, tais como os lipídeos, as proteínas, os oligonucleotídeos e os FS. (SHIA, 2004)

Nesta dissertação, FS de terceira geração foram sintetizados a partir de AuNps funcionalizadas a Clorina e6 (Ce6) modificada por tiouréia. A motivação deste trabalho foram as buscas pelos aumentos da hidrossolubilidade e da eficiência. As caracterizações das nanoestruturas e do complexo Ce6-AuNps foram feitas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia no UV-visível (UV-vis), Espectroscopia no

Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e por Potencial Zeta. Para além disto, foram feitos ensaios de fluorescência e de citotoxicidade, na presença e na ausência de radiação infravermelha, em cultura de células mamárias tumorais malignas, da linhagem MDA-MB 468.

1.1.Objetivos

- Objetivo Geral

Sintetizar Nanopartículas de ouro funcionalizadas a Clorina e6 pela rota de reação química via carbodiimida.

- Objetivos específicos

✓ Sintetizar e caracterizar a morfologia e o tamanho das Nanopartículas de ouro por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), a banda de ressonância e cálculo da concentração da solução coloidal por UV-visível (UV-vis), a estabilidade química coloidal por potencial Zeta e o tamanho das nanopartículas por Espalhamento dinâmico de luz (DLS).

✓ Investigar as alterações espectrais ocorridas após o processo de modificação química do complexo Ce6-tiouréia e do processo de funcionalização do complexo Ce6-AuNps, utilizando as técnicas de UV-visível (UV-vis) para análise das bandas de absorção e por Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) para análise das alterações bioquímicas.

✓ Avaliar a eficiência do complexo Ce6-AuNp para Terapia Fotodinâmica e a sua citotoxicidade em células mamárias tumorais malignas da linhagem MDA-MB 468, na ausência e na presença de radiação, pelos ensaios de fluorescência e de coloração.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

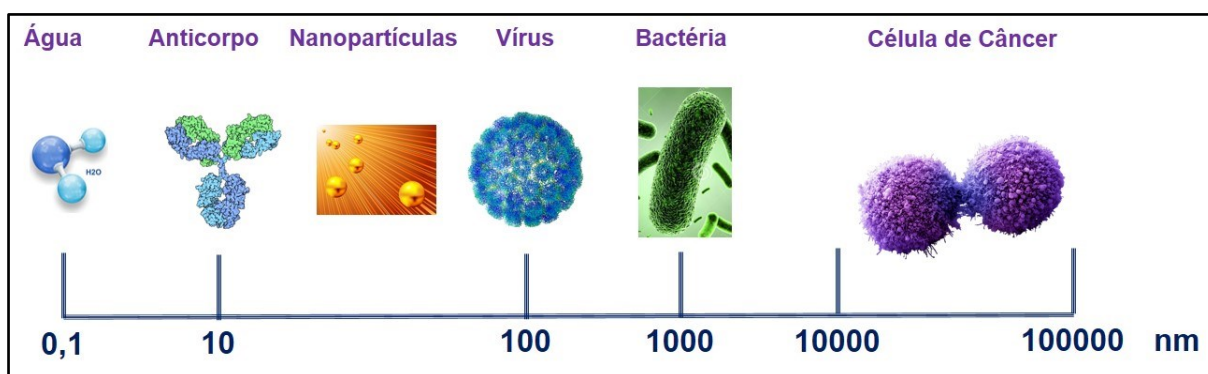
Nesta seção, são abordadas a importância das AuNps e suas aplicações na área médica, a TFD e os processos físicos que ocorrem durante a irradiação, um breve esclarecimento sobre a Ce6 e a descrição das técnicas de caracterização utilizadas.

2.1.As Nanopartículas de ouro

O ouro foi um dos primeiros metais a serem estudados e suas aplicações são datadas de milhares de anos. As primeiras descobertas de AuNps são referenciadas aos Chineses, Árabes e Indianos, por volta do período de V-IV A.C. As aplicações deste metal envolviam o tratamento de enfermidades e estética. (DYKMAN, 2009)

As Nps são partículas que possuem tamanho de 1-100 nm, comparadas as células humanas chegam a ser de 100 a 10000 vezes menores, como ilustrado na Figura 1. Assim, as Nps podem interagir com as biomoléculas de forma sem precedentes, quer seja na superfície ou no interior das células, podendo revolucionar o diagnóstico e o tratamento do câncer. (MOORE, 1976; HARRIS, 2006)

Figura 1: Escala comparativa de estruturas físicas, biológicas e organismos unicelulares.



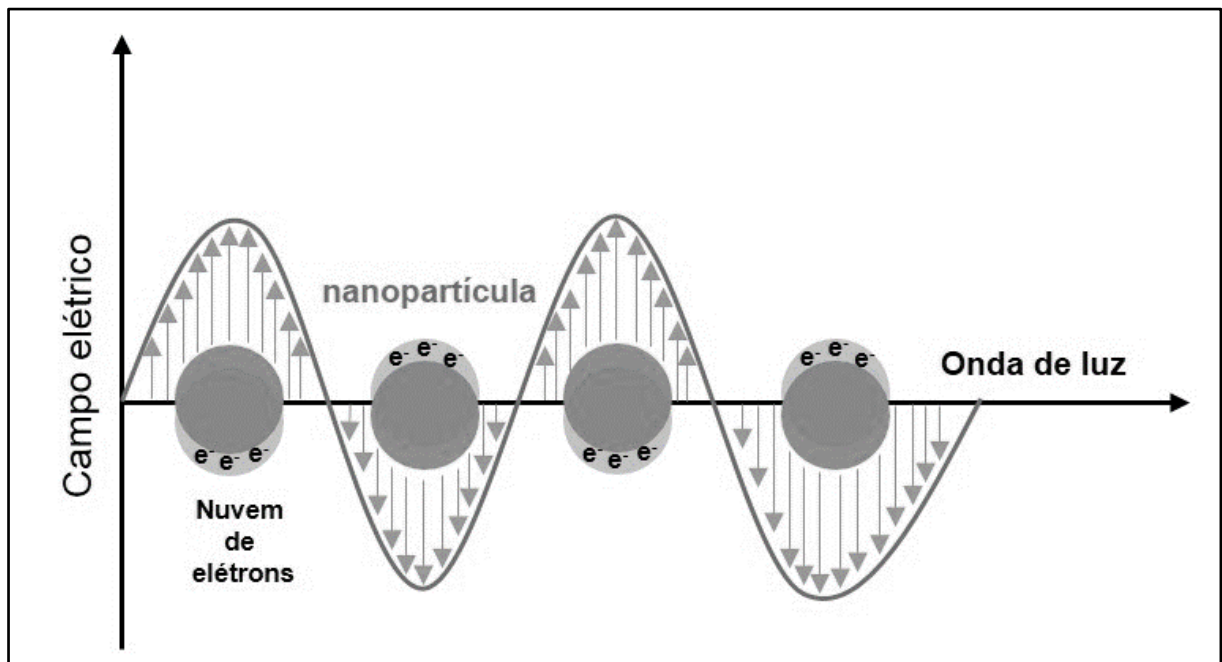
Fonte: Autoria própria.

Na superfície das AuNps existe a disponibilidade de elétrons livres na banda de condução, chamada de nuvem eletrônica. A oscilação coletiva dos elétrons, assistida por um comprimento de onda específico incidido, dá origem a um fenômeno chamado de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL). O efeito de extinção da luz em sistemas moleculares é dominado somente pela absorção, porém, em escala nanométrica,

resultam em fenômenos de absorção e dispersão da luz, com relação direta a dimensão do sistema. (HAMBLIN, 2002; HAMBLIN, 2004)

A Figura 2 ilustra como a nuvem eletrônica de Nps metálicas se comportam na presença de um campo elétrico. Neste contexto, existe uma separação dipolar de cargas na superfície das Nps e a atuação de uma força restauradora, que é gerada pela atração eletrostáticas das cargas separadas. Esta separação de cargas dá origem a um campo elétrico secundário, que também perturba as nanoestruturas próximas. Este processo dinâmico dá origem à formação da RPSL. (KELLY,2003)

Figura 2: Ilustração do comportamento da RPSL em Nps metálicas.



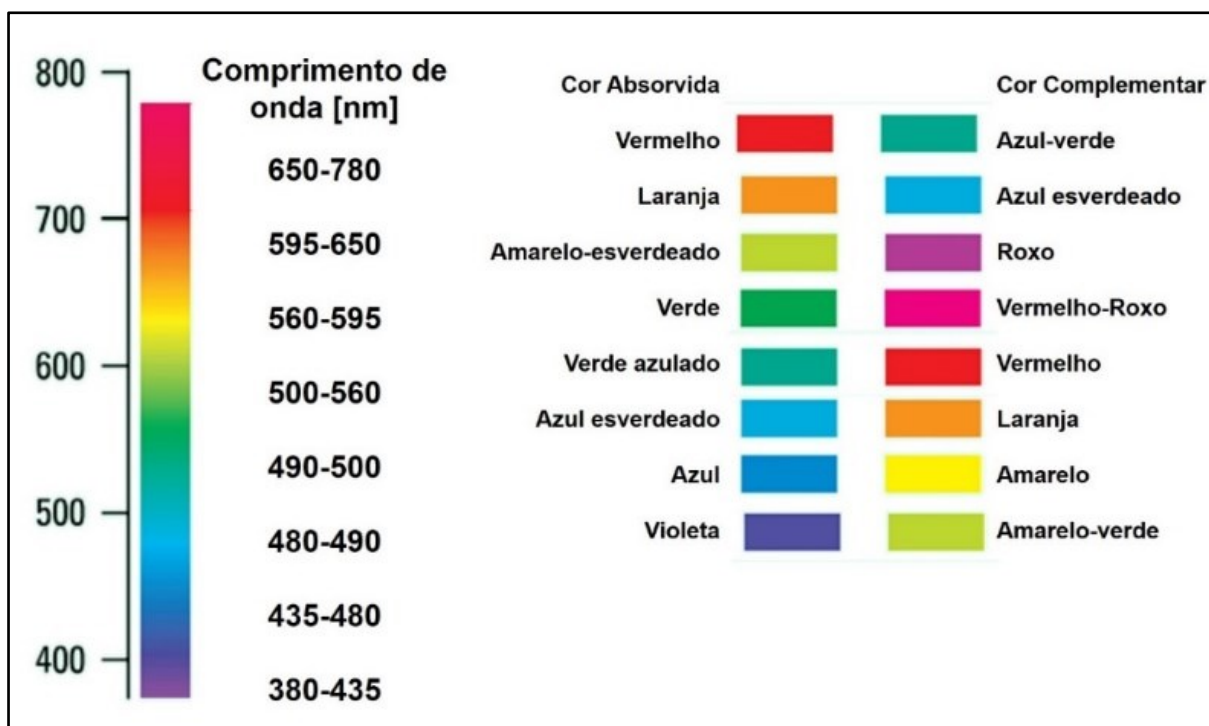
Fonte: Adaptado de KELLY (2003).

O comprimento de onda específico de RPSL é fortemente dependente do tamanho da nanoestrutura e da morfologia da superfície, que estão ligados ao livre caminho médio dos elétrons. (GORMAN, 2006) Esta característica permite que as Nps metálicas sejam utilizadas como sensores, pois sua sensibilidade à mudança química do meio causa a aglomeração das Nps. A mudança de cor da solução acontece pela dependência da RPSL em função do aumento de tamanho das Nps devido à aglomeração. (BONNETT, 2000)

No caso das soluções coloidais, a coloração é dada pelos comprimentos de onda que atravessam a amostra. Na Figura 3 é mostrada uma tabela de cores complementares da região

do visível do espectro de radiação eletromagnética, podendo ser observado os comprimentos de onda e a relação de cores, as cores absorvidas e as cores complementares.

Figura 3: Escala de cores complementares.

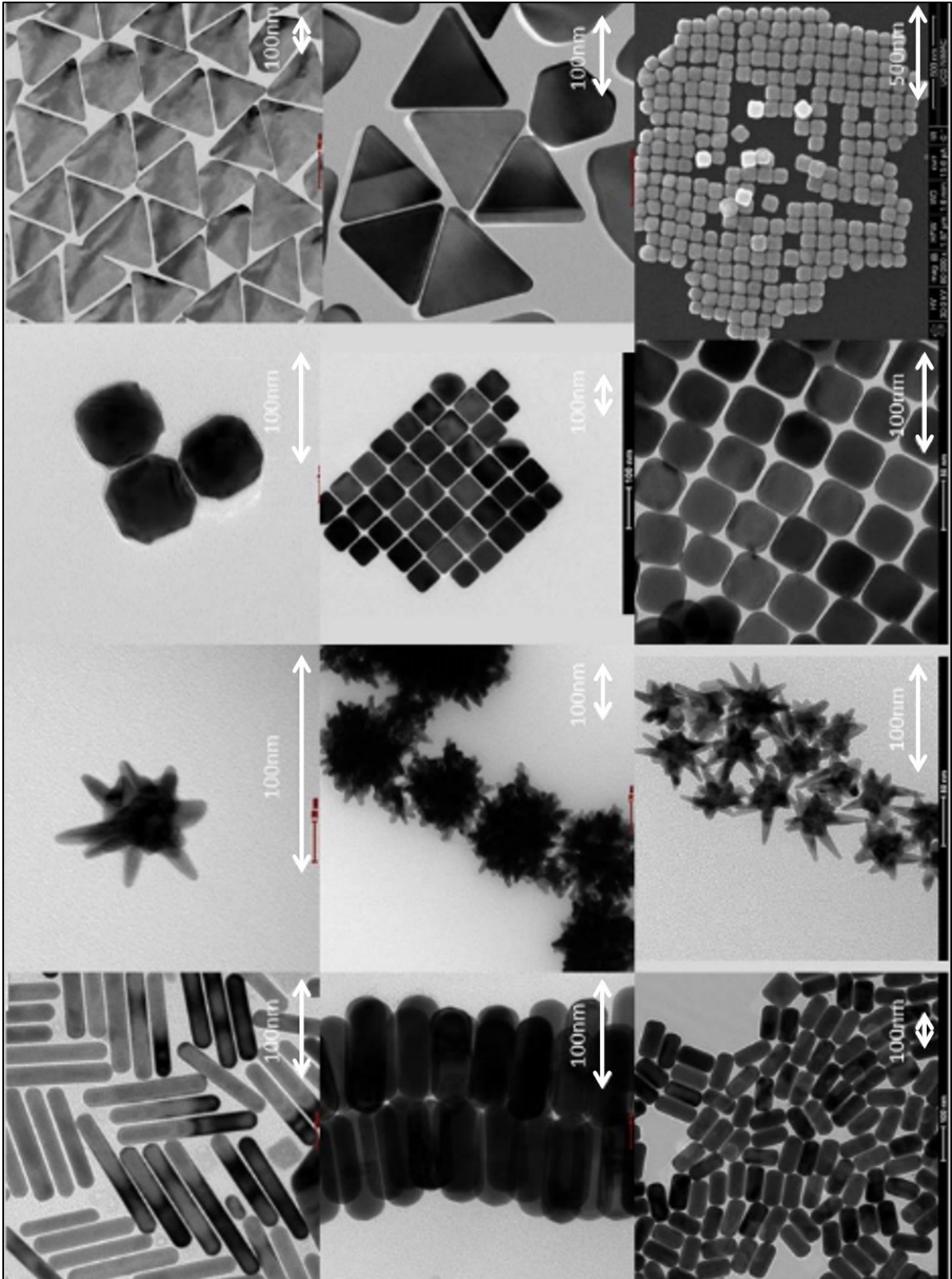


Fonte: Adaptado de OWEN (2000).

As dimensões e formas são parâmetros que controlam as propriedades dos materiais, em escala nanométrica. No entanto, produzir Nps de metais nobres de maneira controlada é um processo complexo. As morfologias mais comuns são aproximadamente isotrópicas, variando de quase esferas a partículas muito facetadas, como octaedros ou mesmo cubos. Porém, recentemente diversos trabalhos têm reportado a produção de AuNps em formato de nanoesferas, (THAKOR, 2011; LAURENT, 2005 e HIRAMATSU 2004) nanobastões, pentagonais, nanofios, (DOUGHERTY, 1998; CALVETE 2009; PASS 1993) nanodiscos (MILLSOTNE, 2005), nanoprismas triangulares ou hexagonais (MILLSOTNE, 2005; EL-SAYED, 2000), como mostrado, na Figura 4, nas micrografias por MET e de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para entender e controlar a formação destes tipos morfológicos é necessário identificar quais são os fatores que podem influenciar o crescimento destas partículas. Desde 1971, a ligação entre moléculas e AuNps revolucionou a

visualização de componentes celulares ou de tecidos por microscopia eletrônica. (NGUYEN, 2010; JAIN 2006)

Figura 4: Micrografias por MET e de MEV de AuNps.

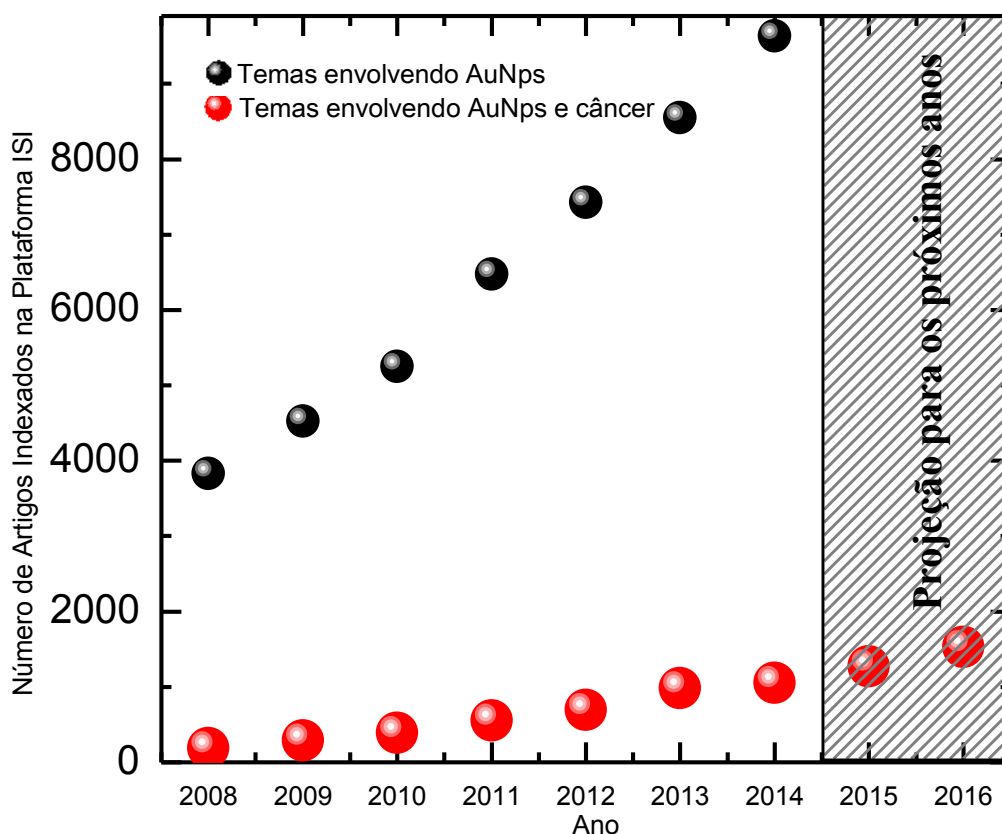


Fonte: FutureNanoNeeds (2015).

O número de pesquisas com AuNps vem aumentando a cada ano. Na Figura 5 é mostrado o número de artigos publicados entre o período de 2008-2014 e a projeção para os próximos anos, por meio da plataforma ISI. Deste modo, é possível verificar a evolução

destes temas e a tendência para os próximos anos, quando é previsto um aumento significativo de pesquisa neste campo.

Figura 5: Estimativa e projeção do número de artigos publicados entre o período de 2008-2014 e os próximos anos.



Fonte: Autoria própria

Esta pesquisa foi realizada utilizando a plataforma Institute for Scientific Information (ISI), em que foi levado em consideração dois conjuntos de dados: artigos publicados por ano envolvendo os temas de (1) AuNps e (2) AuNps e câncer.

Os resultados estatísticos mostram que o tema da dissertação abrange uma área com boas oportunidades de registros de novas patentes e publicações de artigos científicos, além de abordar um problema de saúde pública, buscando contribuir para o avanço de medicamentos mais específicos no tratamento contra o câncer com redução dos efeitos colaterais.

2.2.Síntese das Nanopartículas de ouro

Os métodos mais comuns de sínteses de AuNps são realizados em meio aquoso ou em solventes orgânicos. Estes métodos utilizam um sal de ouro precursor, um agente redutor, e um agente estabilizante, que será responsável pela estabilidade das Nps em solução. A escolha do agente estabilizador é crucial para manter o tamanho e morfologia das partículas, impedindo a aglomeração. (KRENA,1999) Existem dois processos utilizados para síntese das AuNps, a síntese física, conhecida como “top down” (macro para o micro) e a química, conhecida como “bottom up”. Acredita-se que a síntese química seja a mais vantajosa, pois permite o controle do crescimento, estabilidade e permite modificações pós-síntese. (STORHOFF 1998)

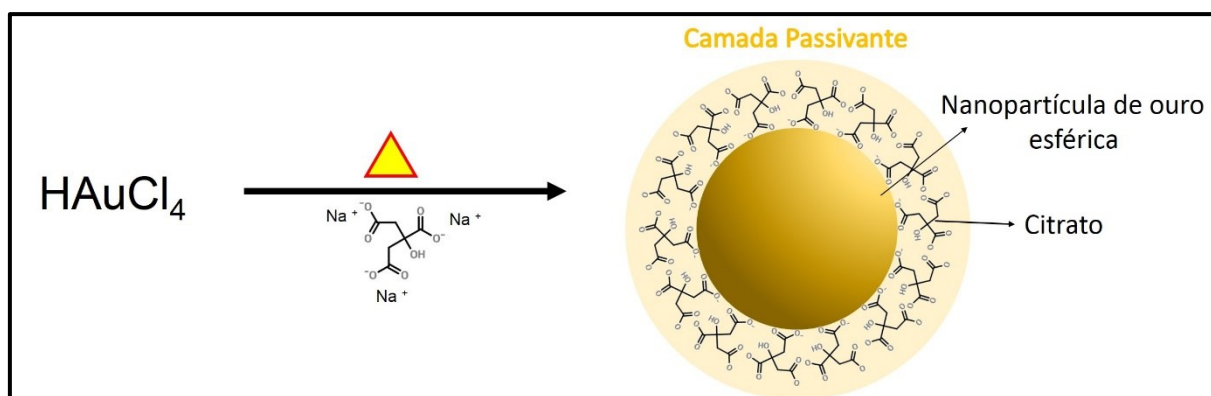
A estabilidade de soluções coloidais depende intimamente da natureza e magnitude da interação entre as partículas constituintes e o meio. Basicamente, existem dois mecanismos de estabilização de Nps coloidais: a estabilização eletrostática e a estabilização estérica. No primeiro caso, a repulsão ocorre porque as Nps possuem a superfície carregada eletricamente, ou seja, as Nps não irão aglomerar por repulsão Coulombiana. Enquanto que no segundo mecanismo, a superfície das Nps é estabilizada por uma camada protetora de outro material, denominado agente passivante ou estabilizador. (KHLEBTSOV, 2011) Ressalta-se que só a utilização da interação eletrostática, para inibir o processo de aglomeração, não é totalmente indicada, pois é sensível a mudança de pH. O uso de estabilizantes, no processo de formação de Nps, é essencial para evitar a aglomeração e aumentar a vida útil da solução coloidal durante o armazenamento. Dentre os passivantes mais usados temos os surfactantes, moléculas orgânicas com grupos polares e polímeros. (BRUST, 2002; JAIN, 2007)

Em 1951, Turkevitch et. al. foi o primeiro a produzir AuNps com boa distribuição de tamanho, reprodutibilidade e estabilidade. Em seu trabalho, o reagente cloreto de ouro (HAuCl_4) foi reduzido via citrato trissódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$), produzindo Nps de aproximadamente 20 nm. (TURKEVICH, 1951) Em 1973, Frens descobriu que variando as proporções entre os reagentes utilizados por Turkevitch, era possível variar o tamanho das Nps. Em seu trabalho Frens sintetizou Nps com tamanhos que variavam de 16 a 150 nm. Porém, de acordo com seus experimentos, foi possível notar que esta relação não é de fácil entendimento, visto que a variação de citrato de sódio pode interferir na dispersão coloidal e morfologia. (FRENS,1973, JI, 2007, NGUYEN, 2011)

Desde 1981, mais de 230 estudos foram publicados utilizando a síntese de AuNps pelo método de redução por citrato de sódio, conforme mostrado na Figura 6, estudando as rotas de

síntese, produtos e subprodutos formados durante o procedimento. (KUMAR, 2007, BALASUBRAMANIAN 2010, CAPEK, 2011)

Figura 6: AuNps estabilizadas por $C_6H_5Na_3O_7$.



Fonte: Adaptado de JI (2007).

2.3. A Teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek

A aplicação de AuNps na área médica vem crescendo bastante, principalmente na genômica, biossensores, testes bioquímicos e imunológicos, química clínica, detecção e fototermólises de microrganismos e células cancerosas, espectroscopia de superfície Raman (SERS), carreadores de drogas, DNA e antígenos, bioimagem ótica e a monitorização de células e tecidos, utilizando sistemas de registro modernos. As Nps podem ser utilizadas em quase todas as aplicações médicas: diagnóstico, tratamento, prevenção e assepsia. (BRUST, 2002; ARYAL, 2006; HE E URBAN, 2005 ZHOU, 2007; NAKA, 2007; GHOSH, 2008; AILI, 2008) Para tornar possível estas aplicações de AuNps é necessário estabelecer um método simples de funcionalização de biomoléculas, que seja competitivo em termos de custo e benéfico.

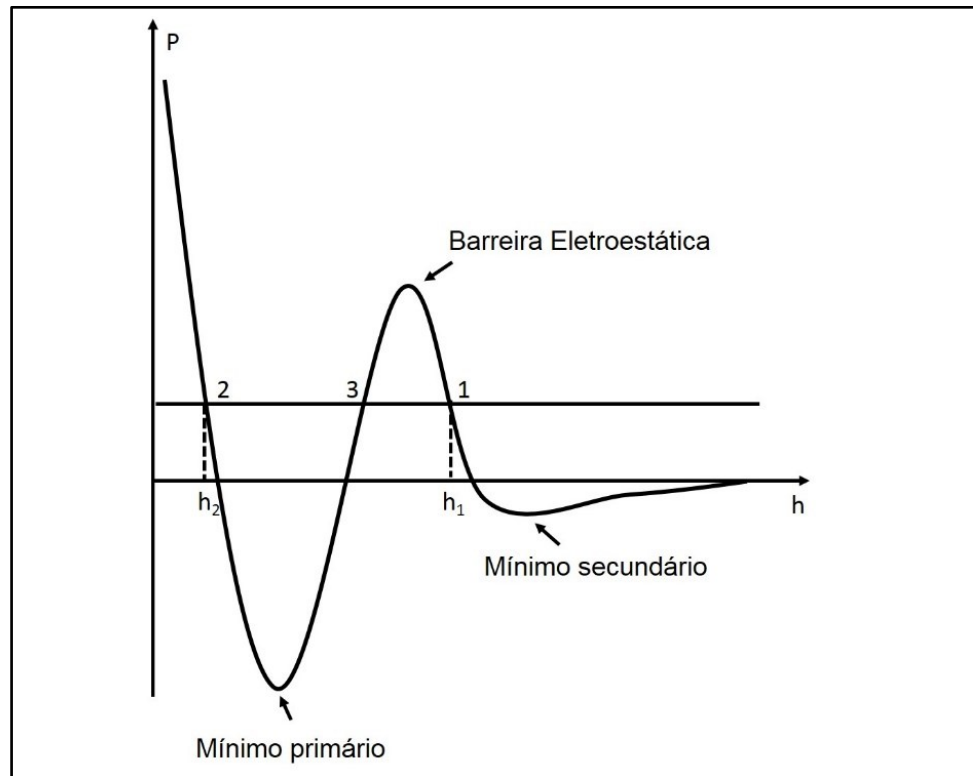
A solução coloidal de AuNps é de fácil obtenção por meio de processo de síntese relativamente simples. O diâmetro médio desta solução é de 20 nm com a presença de uma banda SPR intensa, centrada por volta de 520 nm (cor vermelha escura). Esta banda SPR desloca para maiores comprimentos de onda em função do aumento do diâmetro da partícula, mudando para uma coloração azulada. Assim, a cor da solução de AuNps está relacionada com a distribuição de tamanhos das partículas presentes na solução coloidal. (AMENDOLA, 2009; LE RU E ETCHEGOIN, 2008) No entanto, o aumento do índice de refração do meio

também explica o deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda menos energéticos. (KUMAR, 2007; BALASUBRAMANIAN, 2010; CAPEK, 2011)

A teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) é a mais aceita para explicar a estabilidade de colóides em meio aquoso, em que a energia livre total é composta de dois termos, que representam as interações de Van der Waals e eletrostática. (HIEMENZ, 1997) Como a constante efetiva de Hamaker é sempre positiva, a força de Van der Waals entre duas partículas idênticas é geralmente atrativa. As forças eletrostáticas são geralmente repulsivas para partículas semelhantes, devido ao colapso entre duas camadas elétricas. A combinação das duas interações normalmente gera uma barreira de energia. (KRALCHEVSKY, 2009) A altura da barreira de energia determina se um colóide será estável ou sofrerá coagulação. Os fatores que podem ser utilizados para controlar a estabilidade coloidal são determinados pelos valores da constante de Hamaker, do potencial da superfície e da concentração de eletrólito, pois influenciam a altura da barreira de energia. Quanto maior for o potencial na superfície de uma partícula, maior será a repulsão eletrostática entre as partículas. Quanto menor for a concentração de eletrólito, maior será a distância entre a superfície em que a repulsão é significativa. Portanto, valores de potencial alto e concentrações baixas de eletrólito contribuem para o aumento da barreira de energia. Em outro caso, quanto maior for a constante de Hamaker, maior será a atração entre as partículas, diminuindo a barreira de energia. (ZHOU, 2009; TAYLOR, 2009)

Existem três cenários para a ocorrência de uma colisão entre duas Nps, dependente do tipo de interações partícula-partícula. (1) Se as forças repulsivas são predominantes, as duas partículas colidem, mas se recuperam, e a dispersão coloidal será estável. (2) Quando as forças atrativas e repulsivas se contrabalançam, alguns agregados ou aglomerados de Nps podem aparecer. (3) Quando as Nps são fluidas e as interações entre elas é atrativa, este sistema é instável e isto leva a coalescência das Nps. Na maioria dos casos, a ocorrência da coagulação é determinada pela energia, U , da interação partícula-partícula. Os três tipos de força podem levar a coagulação, (1) as forças de gravidade e força centrípeta, (2) o movimento browniano e (3) a variação de temperatura. Este processo pode ser chamado de rápido ou lento, pois dependem da barreira eletrostática. Além disso, a coagulação é denominada reversível ou irreversível dependendo da profundidade do mínimo primário, mostrado na Figura 7. (KRALCHEVSKY, 2009)

Figura 7: Esquema de pressão versus h , para teoria DLVO.



Fonte: Adaptado de KRALCHEVSKY (2009)

Na Figura 7, os eventos que ocorrem para P maior do que zero são processos de repulsão e os eventos abaixo de zero correspondem a processos de atração. O mínimo primário representa a menor distância entre as Nps, sendo um ponto de coagulação que na maioria das vezes é irreversível. A profundidade do mínimo primário é determinada pela intensidade e alcance da repulsão, que as partículas experimentam quando suas nuvens eletrônicas estão muito próximas. O mínimo secundário é previsto pela teoria DLVO, correspondendo ao ponto de agregação mais fraca, que pode ser desfeita por uma agitação moderada. Este evento é comum em soluções de alta concentração e/ou com partículas maiores. (KRALCHEVSKY, 2009) As condições de equilíbrio são encontradas nos pontos 1, 2 e 3.

Entretanto, quando duas partículas se aproximam mais do que alguns nanômetros, ocorrem fenômenos que a teoria DLVO não explica. As forças estérica, correlação entre íons, oscilatória estrutural, hidratação repulsiva, hidrofóbica atrativa e de solvatação são comumente classificadas como forças não-DLVO. (LEE, 2006; CAPEK 2011) Na maioria dos casos, as Nps são revestidas por uma camada orgânica, a fim de evitar os processos de aglomeração citados acima. Para este tipo de Nps, a natureza química da camada orgânica

desempenha um papel importante na estabilização das partículas. (SONNICHSEN,2005) Forças não-DLVO operam e possuem uma forte influência sobre a estabilidade. (SONNICHSEN,2005, JAIN, 2007) A estabilidade coloidal pode ser controlada por várias metodologias, por exemplo, o aumento da concentração de eletrólitos, ajustando o pH da solução, a adição de sais inorgânicos, mudando o agente estabilizante ou o meio de dispersão. (LEE, 2006)

Nos últimos anos, a funcionalização de AuNps vem sendo estudadas devido a possibilidade combinar certas moléculas orgânicas, que podem responder a certos estímulos, tais como radiação eletromagnética na região do visível, calor, campo magnético e etc. (HARUTA, 1997, OJEA 2009) A forte afinidade de ligação entre AuNps e tióis, dissulfetos e aminas facilita a sua conjugação com biomoléculas, úteis no desenvolvimento de várias aplicações biomédicas, incluindo biossensores e de entrega de drogas. (OJEA, 2009; KATZ 2004) A funcionalização destas Nps por moléculas de alcanotióis inibe a agregação do seu núcleo, mesmo na ausência do solvente, e elas também podem ser precipitadas, redissolvidas e cromatografadas sem perdas aparentes de suas propriedades. (KATZ, 2004)

2.4. Aplicação Biológica

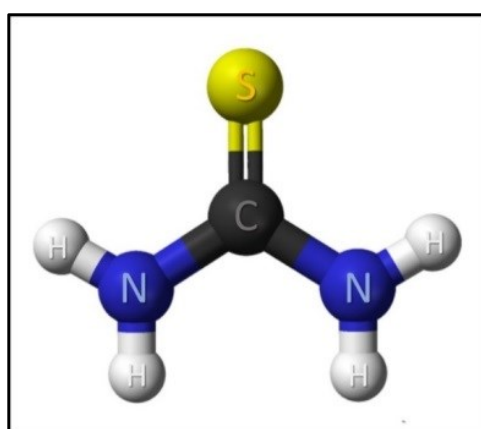
As AuNps são instáveis devido à sua energia superficial elevada. As modificações de sua superfície são necessárias para a sua estabilização contra agregação. As moléculas que recobrem as AuNps desempenham dois papéis, elas estabilizam as Nps, e podem ser oportunamente selecionadas para funcionalizar a AuNps para serem utilizadas em diferentes aplicações. (BATTOCCHIO, 2014)

Alguns grupos funcionais, como ciano (CN), tiol (SH) e amino (NH₂) são conhecidos por terem uma elevada afinidade à superfície de ouro. (YAH, 2013) Usufruindo desta característica, estes grupos funcionais são utilizados para produzir AuNps com uma estreita distribuição de tamanho e funcionalidade. (TERANISHI, 1998; CORBIERRE 2001; MANDAL 2002; SHAN 2003) Recentemente, uma série de peptídeos foram projetados para a estabilização de AuNps com o objetivo de interagir com biomoléculas. (LEVY, 2004) Burt e colaboradores mostraram que as AuNps conjugadas com a proteína globular, albumina de soro bovino, via ligação S-Au fornecia uma maior área superficial para a interação com espécies externas. (BURT, 2004) Por outro lado, alguns grupos funcionais tiolados formados por cadeia carbônica de ligação simples (alcanotióis) ou cadeia benzênica (arenethiols),

funcionalizados a AuNps, já foram demonstrados em trabalhos anteriores. (SANTOSH, 2006; GOREN, 2006; JIMENEZ, 2004; DU, 2005)

Para além destas características, um critério importante na escolha desta molécula é a solubilidade em meio aquoso e o custo benefício. A tiouréia atende todos os requisitos citados e foi utilizada, nesta dissertação, como ligante/intermediador na superfície da AuNps. A Figura 8 mostra a sua estrutura química.

Figura 8: Estrutura química da Tiouréia.



Fonte: Adaptado de SIGMA ALDRICH (2014).

2.5. Toxicidade das Nanopartículas de ouro

Partículas macroscópicas de ouro são consideradas bio-compatíveis e quimicamente inertes. Alguns compostos a base de ouro também são utilizados clinicamente como agentes anti-inflamatórios para tratar artrite reumatoide (Auranofin® e Tauredon®). (ALKILANY, 2010, FINKELSTEIN, 1976) Porém, nanoestruturas de ouro apresentam propriedades térmicas e ópticas (JENNINGS 2007; YAH, 2013) que diferem do ouro em forma de “bulk”, podendo apresentar citotoxicidade dependendo do seu tamanho. (YAH, 2013; ZENG 2011, ALKILANY 2010)

A forma mais comum de se avaliar a biocompatibilidade de AuNps é por meio de ensaios *in vitro* de citotoxicidade, ou seja, avaliar a resposta da cultura de células, após o período de incubação com as AuNps. Para isto, parâmetros como tempo de incubação, dose de AuNps e o tamanho as Nps devem ser levados em consideração. Ensaios de viabilidade celular determinam a sobrevivência e proliferação das células após a exposição. (PERES E

CURI, 2005) A citotoxicidade de AuNps não foi totalmente estabelecida, pois existem inúmeros trabalhos com resultados divergentes.

CONNOR e colaboradores (2005) não encontraram citotoxicidade no estudo feito com células leucêmicas humanas, testando AuNps de 4 a 18 nm estabilizadas com citrato, cisteína, glicose, entre outros. (CONNOR, 2005) SHUKLA e colaboradores (2005) utilizaram AuNps de 3,5 nm em linhagem de células do sistema imunológico, mas também obtiveram os mesmos resultados e registraram a redução do nível de espécies reativas de oxigênio (EROS). (SHUKLA, 2005) VILLIERS e colaboradores (2009) utilizaram células dendríticas e AuNps de 10 nm recobertas por citrato de sódio. Eles descobriram que AuNps não são citotóxicas, e que não alteraram o fenótipo das células. (VILLIERS, 2009)

Em contraste com estes resultados, GOODMAN e colaboradores (2004) descobriram que as AuNps catiônicas de 2 nm são citotóxicas em função da dose administrada. Este fato pode ser explicado pela capacidade destas AuNps interagirem com a membrana celular carregada negativamente, levando-a sua ruptura. Porém, nas mesmas concentração e linhagem celular, a mudança da carga superficial da AuNps tornou-a biocompatível (GOODMAN, 2004). Pan e colaboradores (2007) descobriram que AuNps de 1,4 nm desencadeiam o processo de necrose, dano mitocondrial, e um estresse oxidativo induzido em toda a linhagem de células examinadas. Eles não encontraram nenhuma evidência de dano celular para AuNps de 15 nm, mantendo constante todos os outros parâmetros. (PAN, 2007). PATRA e colaboradores (2007) estudaram a influência de AuNps de 13 nm recobertas por citrato em células tumorais malignas de humanos. Para a linhagem de células de carcinoma de pulmão foi observado citotoxicidade, mas para linhagem de células de carcinoma de fígado não foi citotóxica, nas mesmas condições (PATRA, 2007).

Deste modo, conclui-se que a citotoxicidade de AuNps é influenciada pelos parâmetros de dosagem, tempo de exposição e o tipo de linhagem de células utilizadas. Como na comunidade científica não há uma padronização destes parâmetros a comparação dos resultados é complexa.

2.6.A Terapia Fotodinâmica

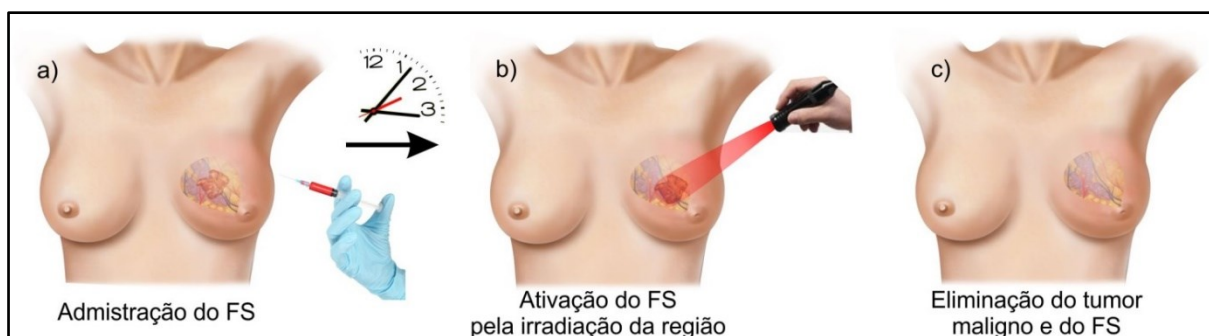
A fototerapia e a fotoquimioterapia são conhecidas desde a antiguidade, sendo seu mecanismo de atuação baseado na interação da luz com moléculas químicas do tecido biológico ou acumulado nestes. Hipócrates estudou a aplicação de luz solar na cura de

doenças do corpo humano, a helioterapia. Os Gregos e os romanos praticavam banhos de sol como um tipo de tratamento para doenças específicas. Os egípcios tratavam vitiligo utilizando uma combinação de plantas e luz solar. (CESTARI, 2007).

O conceito sobre a TFD teve início em 1900, quando Oscar Raab estudou a ação da irradiação do corante acridina em organismos unicelulares (*Paramecium Caudatum*), levando-os à morte. Este foi o primeiro estudo científico do efeito citotóxico de uma droga após incidência de radiação. (RAAB, apud. ZHANG, 2014) No início da década de 50, a síntese da primeira geração de FS foi feita a partir de derivados da Hematoporfirina (HpD). (STERNBERG, 1998) Em 1967, o pesquisador Richard Lipson foi o primeiro a colocar em prática o tratamento de uma paciente com câncer de mama com metástase, assinalando o início da TFD como forma de tratamento contra câncer. (LIPSON, 1967)

A Figura 9 mostra uma ilustração dos passos da TFD, a) em que o FS é administrado via intravenosa, após um período de incubação b) há a ativação do FS pela irradiação da região utilizando um comprimento de onda compatível com o FS e dentro da janela biológica e c) almeja-se a eliminação do tumor e eliminação do FS do tecido. Quando as células tumorais são irradiadas, o FS absorve luz, reage com o oxigênio molecular e produz espécies de EROS que levam à morte celular. (HARRIS, 2006; HAMBLIN 2002) Os conjuntos de processos físicos, químicos e biológicos possibilitam a proliferação dos tecidos saudáveis, com a vantagem de não apresentar efeitos colaterais ou dose cumulativa. (COLUSSI, 1997; HARRIS, 2006; HAMBLIN 2002)

Figura 9:Esquema representando a TFD.



Fonte: Autoria própria.

A utilização da TFD e a fotodeteção de câncer no contexto clínico envolvem a variação de diversos parâmetros, tais como dose da droga, dose de luz, tempo entre a injeção

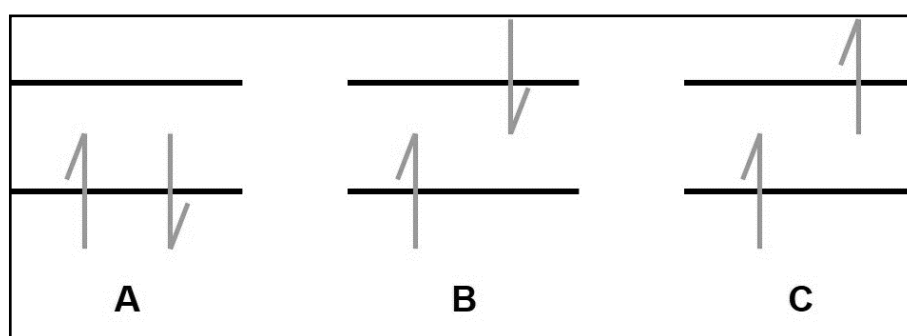
da droga e a irradiação, comprimento de onda de excitação do FS, bem como a pureza química, estabilidade e atividade fotodinâmica dos FS. (NERI, 2002; HAMBLIN 2002)

2.7.Processos Fotoquímicos da Terapia Fotodinâmica

No fenômeno de fotoluminescência molecular ocorre a emissão de radiação eletromagnética quando a molécula excitada volta ao seu estado fundamental, sendo a base de funcionamento de um FS. (ROTOMSKIS, 1997, KOCHEVAR, 1996) Moléculas no estado excitado podem perder sua energia por meio de processos físicos ou participar de reações químicas. Uma forma de quantificar cada um destes processos é por meio da medida do rendimento quântico (ϕ). O ϕ é a razão entre o número de moléculas decompostas e/ou formadas em relação à quantidade de fótons absorvidos durante o processo. (ROSENTAL, 1995; MOORE, 1976)

Dependendo da natureza do estado excitado a fotoluminescência pode ser dividida em fluorescência, quando o estado excitado é o singlete, ou fosforescência, quando a orientação do elétron do estado excitado é invertida. O estado excitado será singlete se o elétron excitado tiver um spin antiparalelo, mas se o spin for paralelo ao seu companheiro, o estado será um tripleto, como mostrado na Figura 10. (HARRIS, 2006; ROTOMSKIS, 1997)

Figura 10: Ilustração representando os estados A) fundamental, B) excitado singlete e C) tripleto.



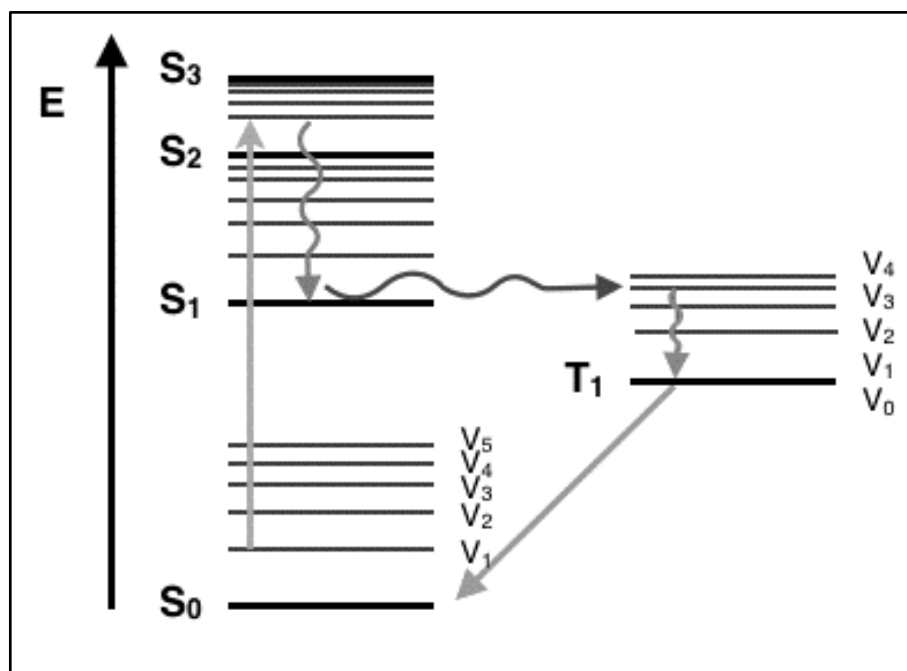
Fonte: Adaptado de HARRIS (2006)

Quando o comprimento de onda é escolhido adequadamente, a energia do fóton interage com os elétrons do estado fundamental (S_0) da molécula do FS, levando a promoção do elétron do orbital ligante para um antiligante desocupado de mais alta energia. O estado excitado inicial chamado singlete é mostrado na Figura 11. Neste estágio existe a

probabilidade da molécula seguir caminhos diferentes quanto à utilização da energia. (HAMBLIN, 2006) Logo após o salto quântico primário, uma série de eventos extremamente rápidos ocorre antes que qualquer reação fotoquímica ou emissão de radiação luminescente possa ocorrer. Independente do estado singlete atingido, o tempo de vida para que aconteça uma reação com o meio ao seu redor é limitado. Assim, existe a probabilidade de transferência desta energia para o estado singlete de menor energia, o estado S_1 , sem a emissão de fótons. A energia adicional pode ser dispersa por meio de processos radioativo (fluorescência) ou não radioativo (relaxamento vibracional), em que parte da energia é convertida em calor.

O processo de cruzamento intersistemas pode acontecer, quando a molécula do FS com estado excitado S_1 passa para o primeiro estado excitado tripleto T_1 . Embora esta transição não seja a de maior probabilidade, ela é a responsável pelo efeito fotossensibilizante, que associados a moléculas reativas ocasiona reações fotodinâmicas com produção de um ou mais tipos de oxigênio reativos. (GORMAN, 2006; BONNET, 2000; DOUGHERTY, 1998)

Figura 11: Diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de HARRIS (2006)

Neste contexto, existem dois tipos de mecanismos de reações classificados como sendo dos tipos I ou II. As reações do tipo I são baseadas na transferência de carga, perda de átomos, fotoadição entre outras reações fotoquímicas biomoleculares. Enquanto, as do tipo II

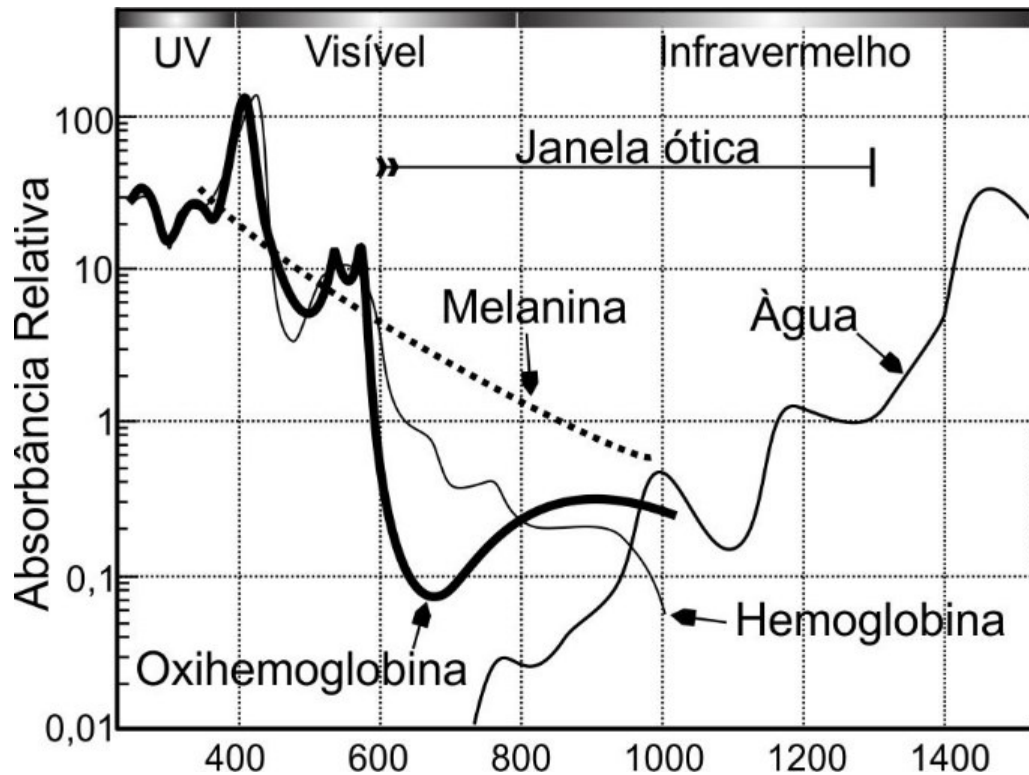
envolvem a transferência de energia da molécula do fotossensibilizador para o oxigênio presente no tecido biológico ou na célula. (PLATEZER, 2008; VAN, 1989)

O mediador do dano do tecido biológico predominantemente será o oxigênio singleto. Sua formação se dá na transferência de energia envolvendo estados excitados do FS para a molécula de oxigênio tripleto. A transferência de energia irá ocorrer por meio da colisão entre as moléculas e isto depende de várias variáveis, como o tempo de vida do FS no estado excitado, a concentração de reagentes, a multiplicidade de spin e a energia dos estados energéticos das moléculas envolvidas neste processo. (KUBLER, 2005; FICHEUX 2009)

2.8. O Fotossensibilizador

A interação da radiação eletromagnética com o tecido biológico é dependente do comprimento de onda utilizado, uma vez que estes tecidos contem diferentes moléculas, que podem absorver e/ou refletir esta radiação. O DNA possui bandas de absorção na região de 200-350 nm do ultravioleta, a melanina na região de 315-980 nm e a hemoglobina entre 400-1002 nm. A água retida nos tecidos absorve acima de 720 nm, na região do infravermelho. A região entre 600-1300 nm é conhecida como janela terapêutica, em que a maioria dos constituintes do tecido possuem menores valores de coeficiente de absorção. Portanto, os comprimentos de onda desta região podem penetrar mais profundamente, sendo ideal para a TFD, para tratamento de câncer, conforme mostra a Figura 12. (JOSEFEN, 2008; BONNET, 1995)

Figura 12: Absorção de hemoglobina, oxihemoglobina e água na região do ultravioleta ao IR próximo.



Fonte: Adaptado de (HUANG, 2009).

Os FS não devem ser tóxicos, sendo compostos por heterociclos capazes de absorver luz e gerar espécies de oxigênio reativo. As primeiras gerações de FS exibiam como efeito colateral a prolongada fotossensibilidade e muitas deles possuíam uma fraca absorção na região terapêutica. (BONNET, 1995) Estes fatores contribuem para a limitação da terapia, mas houve uma intensa pesquisa motivada na correção destes problemas.

Na tentativa de melhorar as propriedades dos FS de 1ª geração, compostos mais seletivos e ativos foram desenvolvidos e são comercializados como FS de 2ª geração. Assim, os intervalos entre a administração do FS e a irradiação do tecido ou cultura são diferentes dos FS de 1ª geração. A partir da modificação destas moléculas foi possível definir as características necessárias para um bom FS, tais como:

- ✓ Solubilidade adequada em meio aquoso;
- ✓ Seletividade entre o tecido maligno e o normal;
- ✓ Não ser tóxico na ausência de luz;

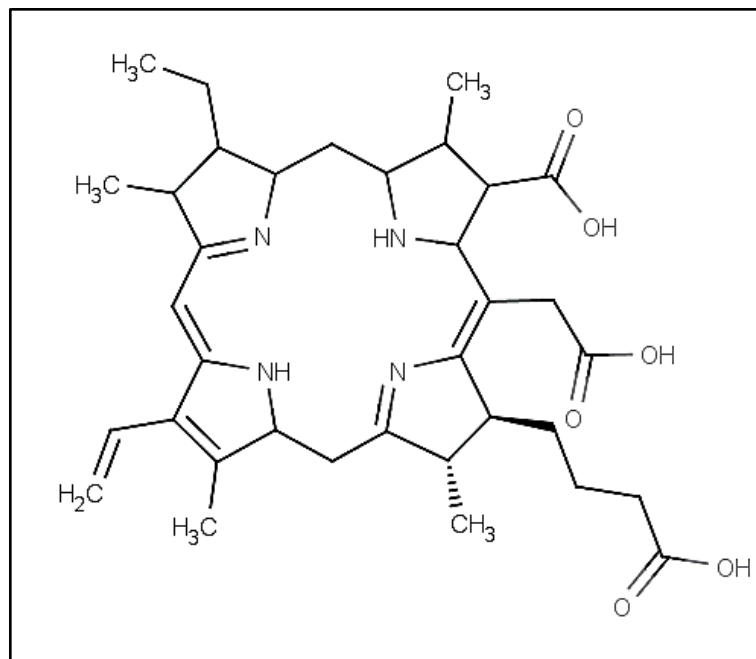
- ✓ Absorver na região do vermelho do espectro do visível;
- ✓ Elevado rendimento de oxigênio singleto;
- ✓ Síntese rápida e com elevado rendimento;
- ✓ Ser uma substância pura e de composição estável.
- ✓ Rápida eliminação do FS pelo organismo. (DOUGHERTY, 1998)

2.8.1. Clorina e6

As clorinas são substâncias derivadas das porfirinas, por meio da saturação da dupla ligação do macro ciclo. Elas são classificadas como tetrapirrólicas e apesar da semelhança com as porfirinas a mudança de um anel pirrol provoca uma alteração na simetria da molécula gerando um deslocamento, da última banda Q, no espectro de absorção na faixa do UV-visível. Assim, as clorinas absorvem fortemente nas regiões do azul e do vermelho e as porfirinas absorvem fortemente na região do azul, logo a cor das porfirinas é caracteristicamente vermelha e das clorinas verde. A forte absorção das clorinas na região de 640-700 nm permite um maior rendimento quântico na formação de oxigênio singleto. (CALVETE, 2009).

A Ce6 é uma molécula assimétrica tendo três grupos carboxílicos ionizáveis. A neutralização da carga destes grupos em pH ligeiramente ácido, aumenta a lipofilicidade da Ce6. Assim, as suas interações com estruturas biológicas, tais como, proteínas plasmáticas e membranas lipídicas são modificadas. Uma vez que o pH do tecido tumoral é mais ácido quando comparado ao tecido normal, a lipofilicidade favorece a seletividade de absorção da Ce6 por células neoplásicas malignas. (GERWECK, 1996, HOOLEY, 1984, MOJZISOVA, 2007) A Figura 13 mostra a estrutura química da Ce6.

Figura 13: Estrutura química da Ce6.



Fonte: Adaptado de FRONTIER SCIENTIFIC (2014)

2.9. A química carbodiimida

A capacidade de modificar as características físicas, químicas e propriedades biológicas das AuNps tem voltado a sua utilização como plataformas multifuncionais para entrega de drogas e aplicações de diagnóstico por imagem. Tipicamente, estas aplicações envolvem a funcionalização das Nps com agentes de segmentação. No entanto, a funcionalização de conjugados de Nps pode apresentar baixa eficiência de acoplamento e alto custo de reagentes, dependendo da otimização do processo.

Na química, somente alguns grupos funcionais possuem afinidade para realizar uma ligação específica, como por exemplo, os ácidos carboxílicos (-COOH) presentes em proteínas. Compostos com o grupo funcional carbodiimida fornecem uma simples e versátil ligação entre ácidos carboxílicos e aminas primárias (-NH₂) via formação de ligação de amidas. As carbodiimidas mais habitualmente utilizadas são o 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), solúvel em água, e o N, N' -díciclohexilcarbodiimide (DCC), insolúvel em água, utilizado para os métodos de síntese orgânica não-aquosas. (NAKAJIMA, 1995, WANG, 2011)

Para aumentar a eficiência deste reagente ou criar intermediários estáveis são adicionados nas reações os reagentes N-hidroxi-succinimida (NHS) ou o seu análogo solúvel em água N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS). (MONAGLE, 1962) A capacidade de fazer a ligação entre aminas primárias e ácidos carboxílicos, utilizando EDC e Sulfo NHS é uma ferramenta poderosa e versátil para a conjugação de peptídeos para carregar proteínas, imobilização de peptídeos para processo de purificação por afinidade, preparação de sondas biomoleculares, e a imobilização de macromoléculas. (MONAGLE, 1962, NAKAJIMA, 1995)

Wu e colaboradores (2014) utilizaram a química carbodiimida para funcionalizar AuNps com glutadiona para crescimento de peptídeos. (WU, 2014) Esta estratégia de síntese fornece uma rota fácil para o desenvolvimento de uma biblioteca de AuNps estabilizadas por peptídeos biocompatíveis para aplicações biomédicas. (WU, 2014) Cho e colaboradores (2012) utilizaram a mesma metodologia para sintetizar AuNps conjugadas a daunorubicina, importante medicamento utilizado no tratamento do câncer. (CHO, 2012)

Hossein e colaboradores (2013) fizeram a conjugação de FS à AuNps. Em seu trabalho sintetizaram conjugados de Protoporfirina IX e AuNps para terapia de câncer cervical. Hossein afirma que este novo FS conjugado poderia ser utilizado em TFD, pois é um excelente veículo para a entrega do FS, que possui natureza hidrofóbica, a superfície das células de Hela. (HOSSEIN, 2013)

Lkhagvadulam e colaboradores (2013) observaram que a conjugação entre AuNps e Purpurina-18-N-metil-D-glucamina aumentou a atividade fotodinâmica do FS quando comparado ao FS sozinho. Além de potencializar o efeito do FS, o conjugado entre o FS e as AuNps poderiam transportar o FS para as células de forma mais eficiente do que quando não conjugado. (LKHAGVADULAM, 2013)

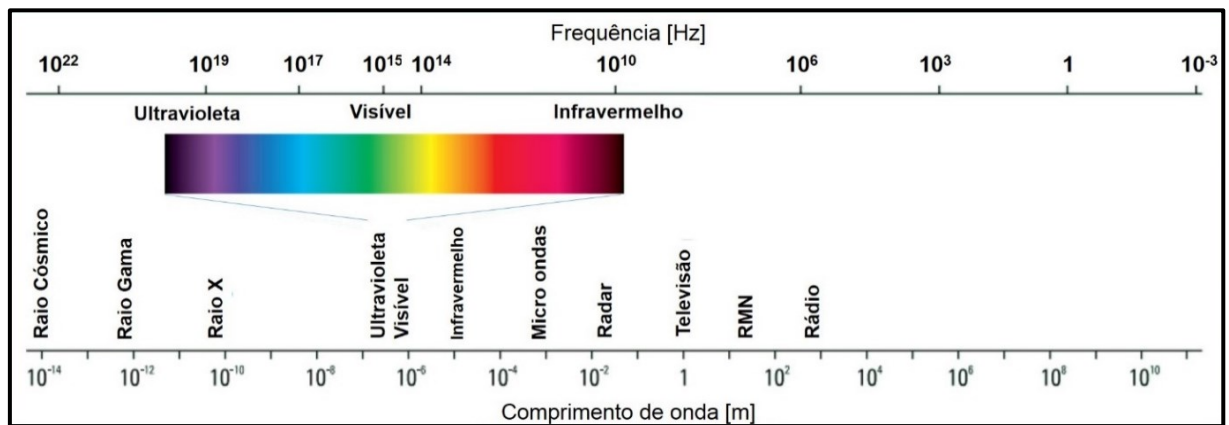
2.10. Técnicas de Caracterização

Nesta seção serão abordadas as técnicas utilizadas para a caracterização do FS sintetizado bem como sua resposta a TFD. Dentre elas estão: espectroscopia no UV-visível (UV-vis), espectroscopia por transformada de Fourier (FT-IR), Potencial Zeta, Espalhamento dinâmico de Luz (DLS) e microscopia eletrônica de Transmissão (MET).

2.10.1. Espectroscopia por UV-visível

A Figura 14 mostra o espectro eletromagnético de radiação, dando ênfase na região entre o ultravioleta ao infravermelho próximo. (OWEN, 2000)

Figura 14: Espectro eletromagnético.



Fonte: Adaptado de OWEN (2000).

A energia associada com a radiação eletromagnética é definida pela Equação 1.

$$E = hv \begin{cases} E = \text{energia (J)} \\ h = \text{constante de Planck } (6.62 \times 10^{-34} \text{Js}) \\ v = \text{frequência (s)} \end{cases} \quad (1)$$

A radiação eletromagnética pode ser considerada uma combinação de alternância de campo elétrico e magnéticos que viajam através do espaço com um movimento de onda. Os comprimentos de onda da radiação e frequência estão relacionados pela Equação 2. (OWEN, 2000)

$$v = \frac{c}{\lambda} \begin{cases} v = \text{frequência (s)} \\ c = \text{velocidade da luz } (3 \times 10^8 \text{ms}^{-1}) \\ \lambda = \text{comprimento de onda (m)} \end{cases} \quad (2)$$

Na espectroscopia de UV-visível (UV-vis), o comprimento de onda é geralmente expresso em nanômetros ($\text{nm} = 10^{-9} \text{m}$). A radiação de maior energia possui menor

comprimento de onda, ou seja, são grandezas inversamente proporcionais. Portanto na região do UV-visível, a luz UV tem maior energia e é suficiente para causar reações fotoquímicas durante a aquisição dos espectros de uma amostra. (OWEN, 2000) Quando a radiação interage com a matéria, uma série de processos podem ocorrer, incluindo a reflexão, dispersão, absorção, fluorescência / fosforescência (absorção e reemissão) e reação fotoquímica (absorbância e quebra de ligações). Em geral, quando se mede os espectros de UV-visível, o evento que se espera observar é a absorção. A absorção da radiação pela matéria aumenta a energia contida nas moléculas (ou átomos). A energia potencial total de uma molécula geralmente é representada como a soma de suas energias eletrônicas, vibracionais e rotacionais, conforme a Equação 3: (LE RU E ETCHEGOIN, 2008)

$$E_{total} = E_{eletronica} + E_{vibracional} + E_{rotacional} \quad (3)$$

A distribuição de energia de uma molécula não é contínua, mas uma série de níveis discretos ou estados. As diferenças de energia entre os diferentes estados são na ordem:

$$E_{eletronica} > E_{vibracional} > E_{rotacional}$$

Quando a luz passa por uma amostra, a quantidade de luz absorvida é a diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I). A quantidade de luz absorvida é expressa como absorvância ou transmitância. A Transmitância é geralmente dada em termos de uma fração, ou como uma porcentagem e é definida na Equação 4: (OWEN, 2000; LE RU E ETCHEGOIN, 2008)

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ ou } T(\%) = \frac{I}{I_0} \times 100\% \quad (4)$$

A absorção é definida como mostrado na Equação 5:

$$A = -\log T \quad (5)$$

Para a maioria das aplicações, os valores de absorção são correlacionados à concentração de uma solução. Os espectros de UV-vis fornecem uma quantidade limitada de

informação qualitativa, visto que, existem substâncias que podem absorver na mesma região. A maior contribuição da absorção em compostos orgânicos resulta da presença de ligações π (isto é, ligações insaturadas).

A presença de uma banda de absorção em um comprimento de onda particular, é um bom indicador da presença de um cromóforo. No entanto, a posição do máximo de absorbância não é fixa, ele depende parcialmente do ambiente molecular do cromóforo e do solvente utilizado. Outros parâmetros, tais como pH e temperatura, podem também causar mudanças na intensidade e o valor do comprimento de onda do máximo de absorbância.

Em 1908, Gustav MIE apresentou uma solução às equações de Maxwell e conseguiu explicar o espalhamento e absorção de luz pelas Nps que tinham tamanho menor do que o comprimento de onda da luz. Esta solução ficou conhecida como Teoria de Mie. (HORVATH, 2009) Utilizando a teoria de MIE, é possível definir a relação entre o coeficiente de extinção (σ_{ext}) e o coeficiente de absorção (σ_{abs}), uma grandeza dependente da frequência incidente, como mostra a Equação 6.

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca} \quad (6)$$

Mie conseguiu prever com alto grau de concordância os espectros de extinção para partículas de tamanhos diferentes, considerando tanto as excitações dipolares quanto multipolares, partindo apenas das constantes dielétricas do meio e da partícula. (OWEN, 2000)

Atualmente, pesquisadores desenvolvem outras metodologias numéricas para aperfeiçoar os cálculos do coeficiente de extinção, visto que a Teoria de Mie é imprecisa para Nps com tamanho inferior a 10 nm. Navarro e colaboradores (2013) descreveram uma equação simplificada para determinar o coeficiente de extinção molar para as AuNpS, $\epsilon_{M\acute{a}x}^{Ouro}$, como mostra a Equação 7. (NAVARRO, 2013)

$$\epsilon_{M\acute{a}x}^{Ouro} = Ad^{\gamma} \begin{cases} A = 4,7 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}, \gamma = 3,3, d \leq 85 \text{ nm} \\ A = 1,6 \times 10^8 M^{-1} cm^{-1}, \gamma = 1.47, d > 85 \text{ nm} \end{cases} \quad (7)$$

Em 1852, Beer descobriu a proporcionalidade entre a concentração molar de uma solução e a absorção de luz por esta solução. Descrevendo que " *A intensidade de um feixe de luz monocromático irá decrescer diretamente à medida que a concentração molar da substância aumente* ". Já em 1870, Lambert correlacionou a transmissão de luz e a espessura da camada do meio absorvente. Um meio transparente homogêneo, quando atravessado por

um feixe de luz monocromática, absorvia igual a fração de luz que o atravessava, mesmo variando a intensidade da luz incidente. Assim, a seguinte lei foi enunciada: " *A intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente* ". (OWEN, 2010, HORVATH, 2009). A Lei de Lambert-Beer correlaciona a luz absorvida está relacionada e a concentração da solução absorvente e o caminho ótico percorrido, como mostra a Equação 8.

$$A = \epsilon bc \left\{ \begin{array}{l} \epsilon = \text{Coeficiente de extinção molar} \\ b = \text{caminho ótico percorrido pela amostra} \\ c = \text{Concentração} \\ A = \text{Absorção} = \log_{10} \frac{P_0}{P} \end{array} \right. \quad (8)$$

Portanto, o espectro de absorção no UV-vis é uma valiosa ferramenta para a caracterização de Nps, de maneira que as bandas de absorção são intrinsecamente dependentes da geometria e distribuição do tamanho das mesmas. O espectrômetro de UV-visível Denovix foi utilizado para identificar a região e a intensidade de absorção das amostras no UV- visível, permitindo fazer medidas rápidas e precisas de microvolume sem a necessidade de diluições (Figura 15).

Figura 15: Espectrômetro de UV-vis Denovix (esquerda) e pedestal da amostra (direita).



Fonte: Denovix (2014)

O equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, foi utilizado para leitura de placas de 24 poços. Este equipamento faz a determinação de fluorescência, utilizando um quartzo de tungstênio e uma lâmpada de halogênio com filtros de interferência de comprimento de onda específica junto ao um detector de tubo fotomultiplicador.

2.10.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica de MET foi desenvolvida na década de 30. (NIXON, 1971) O princípio de funcionamento do MET é semelhante ao MEV. Um filamento de tungstênio aquecido promove a emissão termoiônica de elétrons que são acelerados, sob alto vácuo, em um tubo, em direção à amostra. Um requisito básico para as amostras é a espessura reduzida, além da estabilidade em alto vácuo. O feixe eletrônico transmitido incide sobre uma tela fluorescente, um filme fotográfico ou uma CCD, para coletar a imagem da amostra. (WILLIAMS, 1996; REIMER, 1989)

Dentre as técnicas atuais, a mais utilizada para a observação direta de nanoestruturas, formando imagens a níveis atômicos, é o MET. Assim, esta técnica nos permite fazer a análise da morfologia, tamanho e distribuição das AuNps, já que estes parâmetros são os responsáveis pela resposta ótica da amostra. Não é por acaso que as primeiras publicações sobre a aplicação de ouro coloidal foram dedicadas principalmente ao uso da MET. (WILLIAMS, 1996; NGUYEN, 2010; LEANNE, 2013)

Inúmeros trabalhos relacionando a caracterização de Nps por MET são encontrados, como KAUSHIK e colaboradores (2011) que realizaram o monitoramento de morfologia e área de AuNps sintetizadas por meio da síntese de citrato de sódio e funcionalizadas com proteínas. (KAUSHIK, 2011)

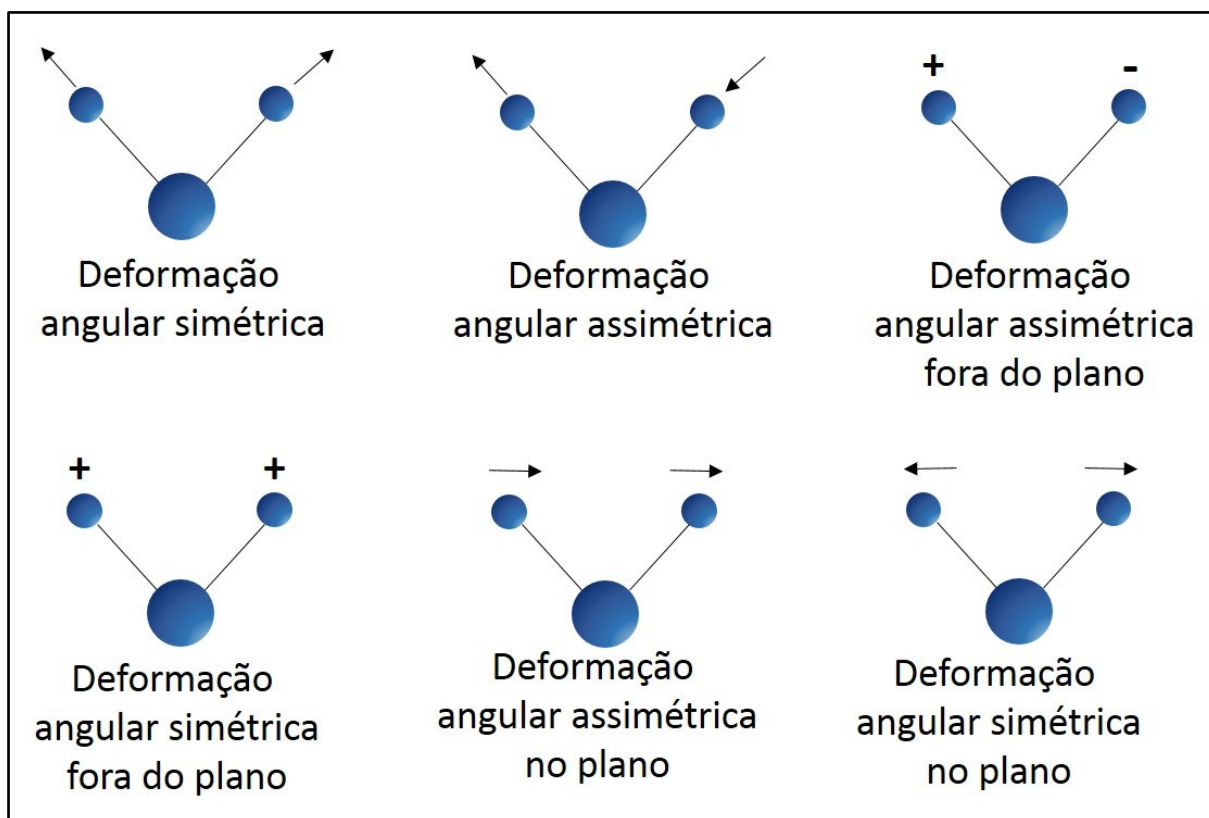
2.10.3. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier

A técnica por FT-IR tem por objetivo o estudo dos níveis de energia de ligações moleculares por meio da interação da radiação eletromagnética com a matéria. (SIVERSTEIN, 2006) Uma molécula é formada por ligações que são dinâmicas e possuem movimento. Cada ligação possui modos de vibração molecular, sendo dependente da natureza dos átomos que a compõe. Para que uma molécula apresente absorção no IR, suas vibrações moleculares têm que apresentar uma alteração no momento dipolar.

Esta mudança no momento dipolar das moléculas está associada a transições vibracionais e rotacionais. Quanto maior for a alteração do momento dipolar, mais intensa será a banda de absorção no IR. As classificações das vibrações moleculares podem ser por deformações axiais ou estiramentos e deformações angulares. Os estiramentos ocorrem pela alteração da distância internuclear dos átomos envolvidos. As deformações angulares, são

representadas pela mudança da angulação das ligações, ou o movimento de um átomo em relação ao restante da molécula. (STUART, 2004) A Figura 19 mostra basicamente seis modos diferentes de vibrações: deformação axial simétrica, deformação axial assimétrica, deformação angular simétrica fora do plano, deformação angular simétrica no plano, deformação angular assimétrica no plano e deformação angular assimétrica fora do plano.

Figura 16: Tipos das vibrações moleculares.



Fonte: Adaptado de NAUMAN (2000).

As moléculas simétricas não apresentam vibrações ativas no IR como as moléculas assimétricas. Isto se deve ao fato que as vibrações simétricas são mais fracas do que as assimétricas, devido a menor mudança do momento dipolar, quando comparada as vibrações assimétricas.

A unidade comumente utilizada na espectroscopia no IR é o número de onda, em cm^{-1} . Este é o número de ondas no comprimento de um centímetro (Equação 9).

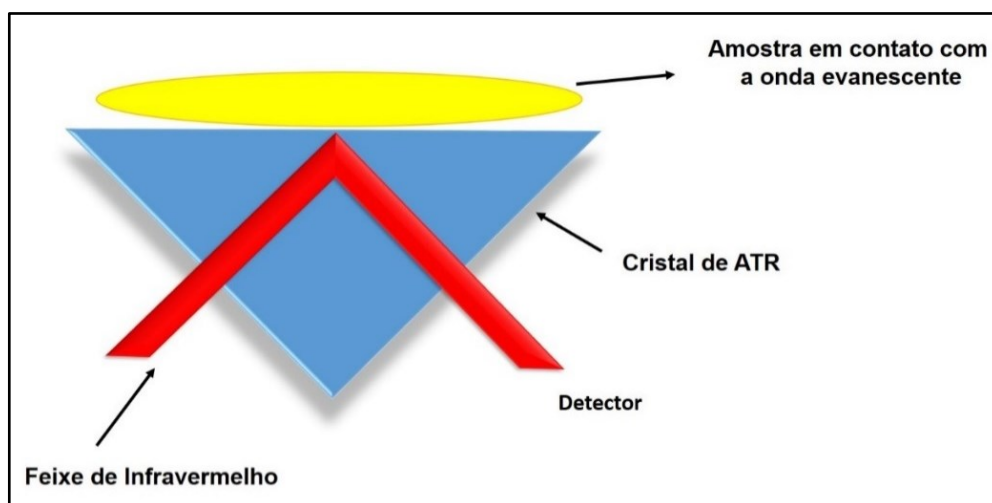
$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (9)$$

Os trabalhos de Einstein, Planck e Bohr indicaram que de diferentes formas a radiação eletromagnética podem ser consideradas como uma corrente de partículas, em que a energia, E , é dada pela equação:

A medida que uma molécula interage com a radiação, um quantum de energia, ou fóton, é emitido ou absorvido. Em cada caso, a energia do quantum de radiação é exatamente a diferença de energia entre os níveis energéticos. A faixa espectral do IR, em que a maioria das moléculas apresentam absorção, está entre 400 a 4000 cm^{-1} . Este fato está relacionado principalmente as transições fundamentais e à existência de uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital. Nesta região, qualquer alteração na estrutura e na conformação das moléculas resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção do espectro. (NAUMANN, 2000; WARTEWIG, 2003)

A reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica de caracterização utilizada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho, que permite que as amostras sejam examinadas diretamente, no estado sólido ou líquido sem preparação prévia. (PERKIN ELMER, 2007, MIRABELLA, 1993) O ATR opera medindo as mudanças que ocorrem em um de feixe infravermelho quando entra em contato com uma amostra. O feixe é dirigido para um cristal opticamente denso, com um índice de refração elevado e com certa angulação. Esta refletância cria uma onda evanescente, que se estende para além da superfície, atingindo a amostra que está em contato direto com o cristal, como mostrado na Figura 20.

Figura 17: Acessório de reflexão total atenuada.



Fonte: Adaptado PERKIN LEMER (2007).

A energia atenuada a partir de cada onda evanescente retorna para o feixe de luz infravermelha, que, em seguida, sai da extremidade oposta do cristal e é transmitido para o detector do espectrômetro. Então, o espectrômetro FT-IR, Figura 21, gera um espectro de infravermelho.

Figura 18: A) Espectrômetro FT-IR Spectrum 400 e B) acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR).

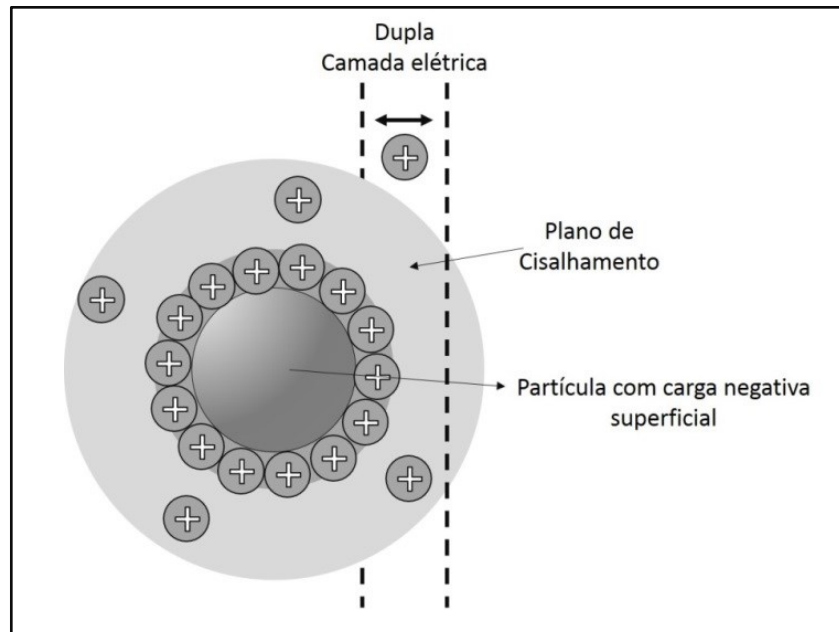


Fonte: Autoria própria.

2.10.4. Potencial Zeta

A Análise Potencial Zeta é uma técnica para determinar a carga de superfície das Nps em solução. As Nps têm uma carga de superfície que atrai uma fina camada de íons de carga oposta à superfície da Nps. Esta camada dupla de íons desloca com a Nps, uma vez que se difunde ao longo da solução, conforme mostrado na Figura 19. O potencial eléctrico no limite da camada dupla é conhecido como o potencial Zeta das partículas e tem valores que variam tipicamente de -100 mV a 100 mV. (BEDÊ, 2010; ANDRADE 2008)

Figura 19: Representação da dupla camada elétrica que envolvem as Nps.



Fonte: Adaptado de ANDRADE (2008).

A magnitude do potencial Zeta é preditivo da estabilidade coloidal. Nps com valores potenciais Zeta superiores ou inferiores a $-30/30$ mV, apresentam normalmente um alto grau de estabilidade. (GORUP, 2010, ANDRADE 2008)

O potencial Zeta é uma ferramenta importante para a compreensão do estado de superfície da Nps e prever a estabilidade química a longo prazo das Nps. Em dispersões com um baixo valor do potencial Zeta, as partículas podem formar agregados devido as atrações inter-partículas de Van der Waals. O potencial Zeta de uma amostra é usado com mais frequência como um indicador de estabilidade de uma dispersão. Grandes potenciais Zeta preveem uma dispersão mais estável. A medição do potencial Zeta, ou atração/repulsão eletrostática, é importante para vários setores, e referência para a reprodutibilidade de sínteses. (ANDRADE 2008; XU, 2008; KHLEBTSOV, 2011)

2.10.5. Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), utiliza a variação do tempo da dispersão da luz em partículas suspensas sob influência do movimento browniano, para obter sua distribuição de tamanho hidrodinâmico, porcentagem de distribuição e índice de polidispersividade. Esta técnica é utilizada para medir desde macromoléculas até pequenas

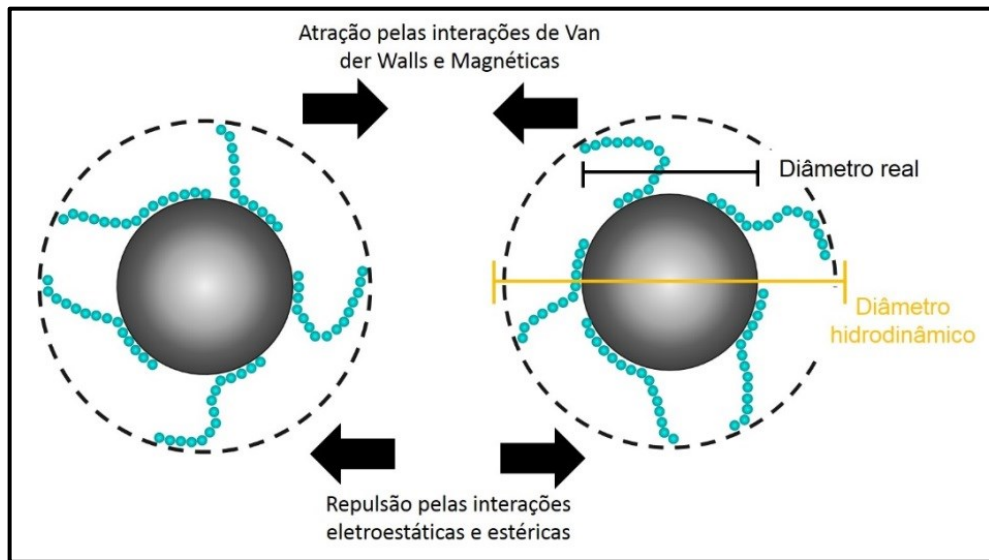
partículas em suspensão. (ANDRADE, 2008; XU, 2008) O tamanho de partículas que podem ser medidas estão entre 0,6 nm e 6 µm em uma ampla gama de concentrações das amostras. A técnica de DLS não é destrutiva e mede uma grande variedade de partículas em um curto período de tempo, sem causar qualquer manipulação do meio circundante. Assim, esta técnica, torna-se ideal para aplicações que requerem baixa concentração da amostra e volume

Uma característica importante para a técnica de DLS é que as partículas pequenas movem-se mais rapidamente quando comparadas as partículas maiores. Assim o espalhamento de luz será dependente do tamanho da partícula e de acordo com a velocidade do movimento browniano. A equação de Stokes-Einstein, Equação 9, representa a relação entre o tamanho da partícula e a sua velocidade devido ao movimento browniano:

$$D_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \left\{ \begin{array}{l} D_H = \text{diâmetro hidrodinâmico} \\ k = \text{constante de Boltzmann} \\ T = \text{temperatura absoluta} \\ \eta = \text{viscosidade do líquido} \\ D = \text{coeficiente de difusão translacional} \end{array} \right. \quad (10)$$

As interações partícula-partícula, nem sempre envolvem o movimento browniano. (KRALCHEVSKY, 2009; KHLEBTSOV, 2011). Existem outras interações que contribuem e ocorrem simultaneamente, como a repulsão eletrostática e a atração de pelas forças de Van der Walls. O coeficiente de difusão não é estritamente de uma partícula individual, pois leva em consideração a camada superficial da partícula e as suas interações com o meio. Deste modo, a técnica por DLS mede o diâmetro hidrodinâmico, que engloba o diâmetro real e a camada passivante das Nps, como mostrado na Figura 23. As técnicas por DLS e MET tornam-se complementares, visto que, a partir de micrografias de MET tem-se a morfologia e estrutura das Nps individualmente e a técnica de DLS tem-se a resposta da camada protetora das Nps.

Figura 20: Esquema das interações entre Nps.



Fonte: Adaptado KRALCHEVSKY (2009).

2.10.6. Microscopia de Fluorescência

O processo de fluorescência ou fosforescência é observado quando compostos orgânicos ou inorgânicos absorvem e subsequentemente irradiam luz. A emissão de fluorescência ocorre quase simultaneamente após a absorção do fóton e sua posterior emissão, que é da ordem de um microssegundo. Quando a emissão persiste por muito tempo após a excitação, o fenômeno é conhecido como fosforescência. Stokes criou o termo "fluorescência" em meados do século 19, quando ele observou que a fluorita mineral emitia luz vermelha quando iluminada por uma radiação ultravioleta. Stokes notou que a emissão de fluorescência sempre ocorria em comprimentos de onda maiores do que o comprimento da luz de excitação. (SPRING, 2003)

A utilização da microscopia de fluorescência tornou-se uma ferramenta essencial pois possibilita a identificação de células e componentes celulares com um alto grau de especificidade. O microscópio de fluorescência pode revelar a presença de uma molécula fluorescente única, por meio da utilização de diferentes corantes, diferentes moléculas alvo podem ser identificadas simultaneamente. (CAI, 2008)

No estudo de tecidos animais ou patógenos, a autofluorescência normalmente é fraca ou não específica. Assim, são adicionados compostos chamados fluorocromos (também

chamados de fluoróforos), que são excitados pela luz de comprimento de onda específico de irradiação e que emitem luz de grande intensidade. Na década de 30, o uso de fluorocromos na biologia iniciou com o intuito de corar alguns tipos de patógenos. Os fluorocromos são altamente específicos as estruturas em estudo, e possuem um rendimento quântico significativo. (SPRING, 2003) O crescimento da utilização dos microscópios fluorescentes está intimamente ligado ao desenvolvimento de centenas de fluorocromos, com curvas de intensidade de excitação e emissão conhecidos e estrutura biológica bem compreendido.

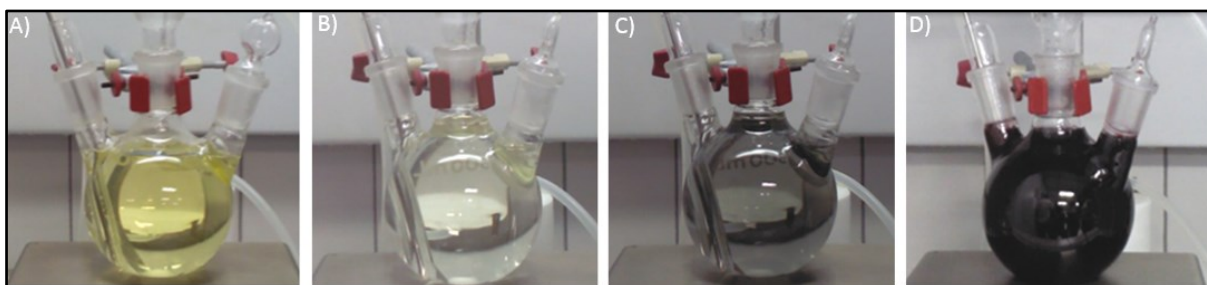
3. METODOLOGIA

Neste tópico foram abordadas as metodologias de síntese e de caracterização do FS com as AuNps e dos ensaios de citotoxicidade.

3.1. Síntese de Nanopartículas de ouro

A síntese de AuNps foi baseada na metodologia TURKEVICH com algumas modificações. (TURKEVICH, 1951) Uma solução de 500 mL de cloreto de ouro III trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, 520918, 99,9% de pureza) a 0,04%, foi aquecida em um agitador magnético microprocessador (Quimis Q261M23) até $\sim 98^\circ\text{C}$. Logo em seguida, 50 mL de citrato de sódio tribásico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, S4641, 90,0 % de pureza) a 1% foi adicionado. Então, rapidamente foi possível observar a mudança da coloração da solução como mostra a Figura 16. Após a mudança total da cor o aquecimento foi cessado e a solução coloidal foi mantida em temperatura ambiente até o total resfriamento e em seguida armazenada a 4°C ao abrigo da luz.

Figura 21: Síntese de AuNps: a) solução de cloreto de ouro; b) adição de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$; c) início da reação de redução; e, d) solução coloidal de ouro.



Fonte: Autoria própria.

3.2. Clorina e6

A Ce6 ($\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$, Frontier Scientific, Inc., MFCD08669566, 95,0% de pureza) foi diluída em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH), na concentração de 0,1 M e pH 12. Em seguida foi acrescentado DMSO na proporção de 1:1. Então o pH final da solução foi ajustado para 6,5, pois é o pré-requisito no processo de funcionalização. A concentração final

de Ce6 na solução foi de 5mg/mL. A recomendação do fabricante foi de utilizar soluções preparadas na hora, “fresh solution”.

3.3. Tiouréia

A funcionalização entre a AuNps e a Ce6 necessita de uma molécula tiolada intermediária, que fosse inserido na estrutura química da Ce6. Assim, uma solução de tiouréia (H_2NCSNH_2 , Synth, T1017.01.AG, 99,0% de pureza) foi preparada a 4 mM. Para isto, $30,448 \pm 0,001$ g de tiouréia foram diluídos em 100 mL de água ultra pura. A esterilização desta solução foi feita por filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$.

3.4. Funcionalização da Clorina e6 à Tiouréia

Primeiramente as soluções de sulfo-NHS (Thermo Scientific, 24510, 98,0% de pureza) e EDC (Sigma Aldrich, 22980, 98,0% de pureza) foram preparadas previamente ao uso. Ambos os reagentes são higroscópicos /reativos em O_2 , sendo necessária a utilização de uma câmara de luva. A solução de sulfo-NHS ($40,7 \text{ mg/mL}$) foi preparado em solução tamponada com fosfato (PBS) a 10 mM e $\text{pH } 6,2$. A solução de EDC (16 mg/mL) também foi preparada na mesma concentração e pH .

A ligação da Ce6 à tiouréia (Ce6-tiouréia) foi feita a partir da química carbodiimida. Inicialmente $108 \mu\text{L}$ da solução de Ce6 foi misturada a $2.990 \mu\text{L}$ de sulfo-NHS, e em seguida adicionado $3.900 \mu\text{L}$ de EDC. Então, a solução foi misturada a cada 5 minutos, por 30 min. Então, $4.3006 \mu\text{L}$ da solução de tiouréia foi adicionado e novamente a solução foi agitada ocasionalmente por 120 min. Para parar a reatividade dos produtos em excesso foi acrescentado $5.42 \mu\text{L}$ de NaOH a $0,1 \text{ M}$.

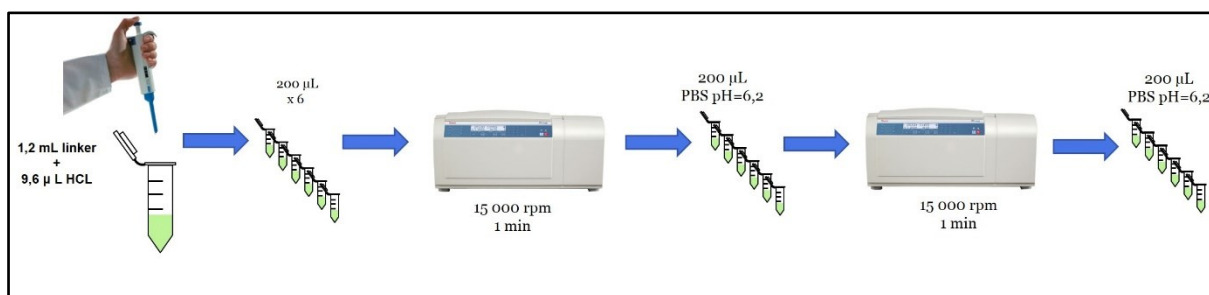
Tabela 1: Proporção entre os reagentes utilizados na reação carbodiimida.

Reagentes	Sulfo-NHS:Ce6	Sulfo-NHS:EDC	EDC:Tiouréia	EDC:Ce6	Ce6:Tiouréia
Proporção molar	25	2.5	10	10	1

Na finalização deste processo é feita a purificação da solução, tendo objetivo de descartar os reagentes não ligados (Figura 27). Um volume de 9.6 μL de ácido clorídrico (HCL) foi adicionado a cada 1,2 mL da solução.

A amostra foi aliquotada em 6 microtubos com o volume de 200 μL para facilitar o processo de centrifugação. Então, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e 200 μL de PBS foram adicionados em cada microtubo. O processo foi repetido e as amostras armazenadas a 4 $^{\circ}\text{C}$, em frasco âmbar.

Figura 22: Esquema de purificação da amostra sintetizada.



Fonte: Autoria própria

Após o processo de purificação, as amostras foram caracterizadas por FT-IR para a confirmação da ligação amida formada.

3.5. Funcionalização à Nanopartículas de ouro

O volume total de Ce6-tiouréia sintetizado e purificado foi adicionado a 10 mL de solução de AuNps e incubados sob agitação por 24 horas. Após este período, as amostras passaram pelo mesmo procedimento descrito acima, para a purificação, com exceção da adição de HCL.

3.6. Análise por UV-visível

Os espectros foram adquiridos nas regiões de 190 a 840 nm com resolução espectral de 1nm. As análises de UV- visível das amostras foram feitas com 2 μL da solução coloidal

pipetadas no pedestal do equipamento Denovix, modelo DS-11. Os gráficos foram feitos por meio do programa Origin versão 8.5.1.

3.7. Análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de MET foram adquiridas em um microscópio Tecnai 12 (FEI), com feixe de elétrons de 80 keV cujo comprimento de onda é de 15,5 pm, pelo Dr. Kevin Hewitt no laboratório da Universidade de Dalhousie. As amostras foram preparadas adicionando-se, com auxílio de uma micropipeta, uma gota dos materiais dispersos em solventes adequados, sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono. A distribuição de tamanho das Nps foi mensurada por meio do programa ImageJ e os gráficos feitos pelo programa Origin versão 8.5.1

3.8. Análise de FT-IR

Os espectros foram coletados pelo Espectrômetro FT-IR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) com o acessório de Reflexão Total Atenuada com cristal de diamante (ATR), em temperatura ambiente, no laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap. A medida de background foi feita no ar na faixa de 4000-900 cm^{-1} , com 64 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Então, uma alíquota de 10 μL das amostras foi depositada no cristal e secas. As aquisições espectrais foram feitas na mesma condição da medida de background, sendo o espectro da amostra uma média de 20 varreduras.

3.9. Cultura de Células

A linhagem humana de células tumorais mamárias, ATCC MDA-MB 468, foi escolhida para verificar a eficiência do novo FS nanoestruturado. As células foram cultivadas em garrafa estéreis de polipropileno de 25 cm^2 (ATPP). As condições de cultivo foram em estufa (Thermo Scientific, water Jacket serie 8000) a 37°C, 95% de umidade e livre de CO_2 . O meio de cultura escolhido para o cultivo foi o Leibovitz (Sigma life Science, L4386-10x1L) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, 16000-044) e 1% de Penicilina e Estreptomicina (PenStrep) (LGC Biotecnologia BR30110-01). Todo o

procedimento de manipulação foi realizado em ambiente estéril, por meio de um fluxo laminar (Thermo Scientific MSC-Advantage).

Para o congelamento das culturas de células, inicialmente a garrafa de cultivo foi lavada com PBS, com concentração de 10 mM e pH 7,4. Após este procedimento 5 mL de tripsina EDTA (Life Technologies, 25200-072) foram adicionados como agente desagregante. Decorridos 5 a 8 minutos, as células aderidas foram liberadas e ficaram suspensas em solução, possibilitando sua transferência para um tubo 50 mL. Então, 5 mL de meio de cultura Leibovitz foi adicionado e em seguida centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado pelo método de inversão e a solução foi lavada novamente. Após a retirada do meio de cultura foi adicionado uma solução apropriada ao congelamento. Esta solução é composta de 500 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, D2650, 99,7% de pureza), que tem a função de agente criopreservante, e 9,5 mL de SFB.

Após a resuspensão das células em meio de congelamento, as células foram separadas em alíquotas de 1 mL cada e distribuídas em tubos de criopreservação. As amostras seguem os processos de congelamento, que consistem em:

- 2 horas a -20°C
- 24 horas a -80°C
- Submersão em nitrogênio líquido até a sua utilização. (PERES E CURI, 2005)

Para o descongelamento, o conteúdo do tubo criogênico é retirado do nitrogênio líquido, cuidadosamente homogeneizado, e transferido para um tubo Falcon contendo meio de cultura Leibovitz. A suspensão de células foi lavada, pois é necessária a retirada da solução criopreservadora, e após o descarte do sobrenadante foi adicionado meio de cultura Leibovitz suplementado com 10% de SFB e 1% de PenStrep. Esta solução contendo as células foi transferida para a garrafa de cultura e mantida em estufa.

O repique (subcultivo) das células foi realizado para manter a atividade celular e fornecer condições para que sua reprodução ocorra. Assim, a garrafa de cultura foi tripsinizada e lavada conforme o protocolo descrito anteriormente. Após lavagem, o sobrenadante foi descartado pelo método de inversão e ressuspendem-se as células em meio de cultura suplementado. A seguir, as células foram distribuídas em novas garrafas de cultura. Para o controle do cultivo, algumas alíquotas de células foram mantidas em nitrogênio líquido. (PERES E CURI, 2005)

3.9.1. A Terapia Fotodinâmica

Para o ensaio citotóxico, as células foram tripsinizadas e lavadas com solução PBS, e então distribuídas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células /mL. Após sua adesão à placa, período aproximado de 24 horas, os FS foram incubados entre 2-4 horas. O meio que contém os FS então foi retirado e substituído por um novo e a placa foi irradiada pelo equipamento light-IRRAD LED5 - 660 (Biopadi), em 660 nm e 25 mW (Figura 23), do Laboratório de Terapia Fotodinâmica.

Figura 23: Equipamento light-IRRAD LED5 - 660 (Biopadi).



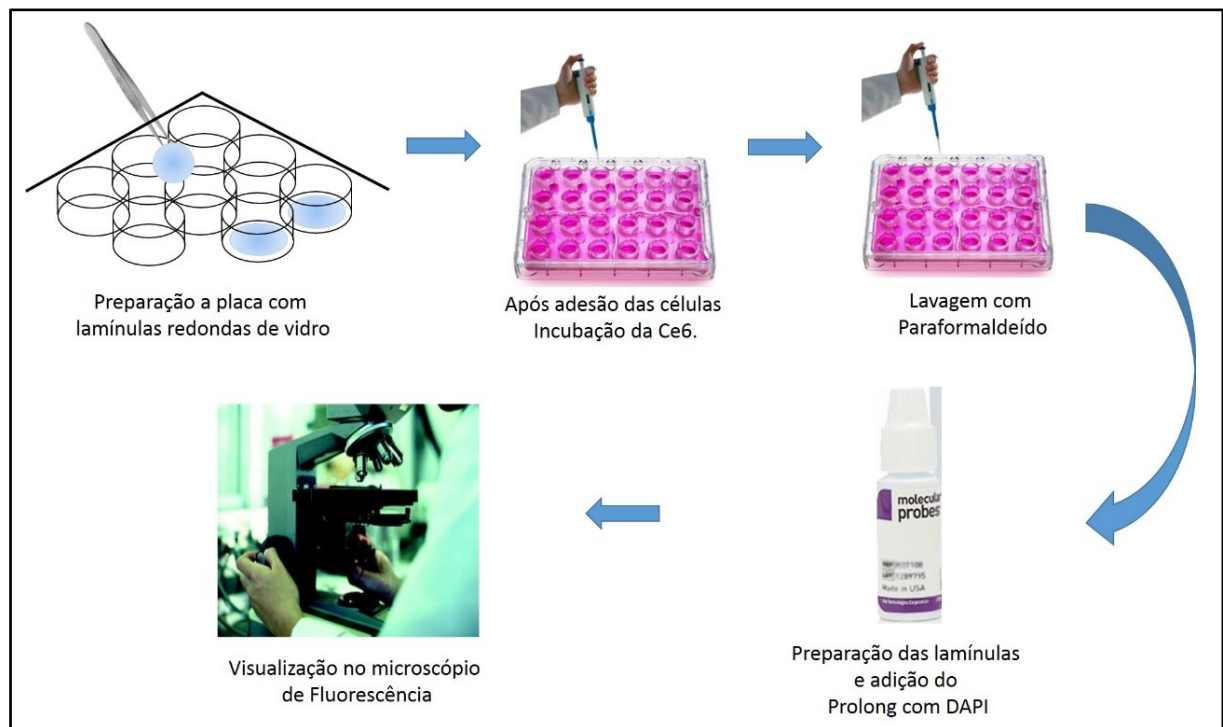
Fonte: Autoria própria.

3.9.2. Ensaios por Microscopia de Fluorescência

Para os ensaios de Microscopia de Fluorescência foram utilizadas lamínulas circulares de borosilicato, que foram posicionadas no fundo dos poços de placas de 24 poços como mostrado na Figura 24. As células foram tripsinizadas e lavadas com solução PBS. Em seguida, foi distribuída uma concentração de 1×10^5 células/mL por poço. Após sua adesão num período aproximado de 24 horas, quatro grupos foram criados, o grupo I foi incubado com Ce6 por 2 horas (concentração de $10 \mu\text{g/mL}$), o grupo II foi incubado com Ce6 por 4 horas (concentração de $10 \mu\text{g/mL}$), o grupo III foi incubado com Ce6 por 8 horas

(concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$) e o grupo IV sem FS (grupo controle). Após os períodos descritos o meio foi então retirado, os poços lavados com PBS e as células foram fixadas com o paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Decorrido esse período os poços foram novamente lavados com PBS e as lamínulas foram retiradas da placa e montadas nas lâminas com o Prolong® Antifade (Life Technologies, P36971). Após 24 horas as lamínulas foram seladas e analisadas pelo microscópio de fluorescência Leica DM 5000 B com a câmera Leica DFC 360FX, pelo Dr. Marco Antônio no laboratório da Universidade de Campinas.

Figura 24: Preparação das amostras para a Microscopia de Fluorescência.



Fonte: Autoria própria.

3.9.3. Ensaio de Viabilidade Celular

Para os ensaios de viabilidade celular, dois métodos foram escolhidos. Estes métodos possuem diferentes interpretações e apresentam resultados complementares, o método colorimétrico por 3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, M5655, 97,5 % de pureza) e de colorimetria por Tetrasódio 3,3'-(3,3'-dimetil[1,1'-bifenil] -4,4'-diyl) bis(azo)] bis [5-amino-4-hidroxynaphthaleno-2,7-disulfonato (Azul de Tripán) (Sigma Aldrich, T8154).

O método colorimétrico por MTT é utilizado para verificar a atividade mitocondrial após a TFD. Este é um método rápido que envolve a redução do sal de MTT, de cor amarela, a um produto azul chamado Formazan, que absorve fortemente em 570 nm. Esta absorção pode ser facilmente detectada por um espectrofotômetro UV-Vis. As desidrogenases mitocondriais das células vivas são responsáveis por esta reação de redução, e ocorre se há um nível significativo de metabolismo oxidativo (STOCKERT, 2012). Assim, foi possível medir a atividade mitocondrial após o ensaio citotóxico.

O ensaio ocorre após 18 horas do término da terapia. As células que estavam na placa de 24 poços foram retiradas da estufa e para cada poço foram adicionados 100 µL de MTT, previamente preparado a uma concentração de 5 mg/mL. Decorridas 4 horas, quando observado a formação de cristais de Formazan, de coloração azul, o meio foi retirado e foram adicionados 200 µL de DMSO para a solubilização dos cristais. Em seguida, é feita a leitura de absorção de UV-vis em triplicata, pelo equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader do Laboratório de Engenharia Biomédica aplicada. Os cálculos de atividade mitocondrial são feitos após comparação da absorbância (Abs) com os grupos controle, conforme a Equação 10.

$$\textit{Atividade mitocondrial} (\%) = \frac{\textit{Abs}_{\textit{amostra}} - \textit{Abs}_{\textit{branco}}}{\textit{Abs}_{\textit{controle}} - \textit{Abs}_{\textit{branco}}} \times 100\% \quad (10)$$

O método de coloração por Azul de Tripán mede a viabilidade celular da cultura em questão. Este reagente é excluído do citoplasma das células viáveis, visto que, as células mortas são incapazes de fazer sua exclusão e são coradas de azul. (PERES E CURI, 2005; STOCKERT, 2012). Neste método, após decorridas 18 horas da terapia, foram adicionados 500 µL de tripsina para cada poço da placa de 24 poços. Após a liberação das células aderidas, foram adicionados 500 µL de meio de cultura suplementado. Em um tubo de microvolume, misturaram-se 50 µL da solução de azul de tripán e 50 µL da solução contendo a suspensão das células. Deste volume, 10 µL foram retirados e pipetados em uma câmara de Neubauer, em que líquido atravessa o grid por capilaridade e fica retido entre a câmara e a lamínula. A câmara foi então levada ao microscópio para a contagem das células. A porcentagem de viabilidade celular é dada pela Equação 11.

$$\textit{viabilidade celular} (\%) = \frac{\textit{número de células não coradas}}{\textit{número total de células}} \times 100\% \quad (11)$$

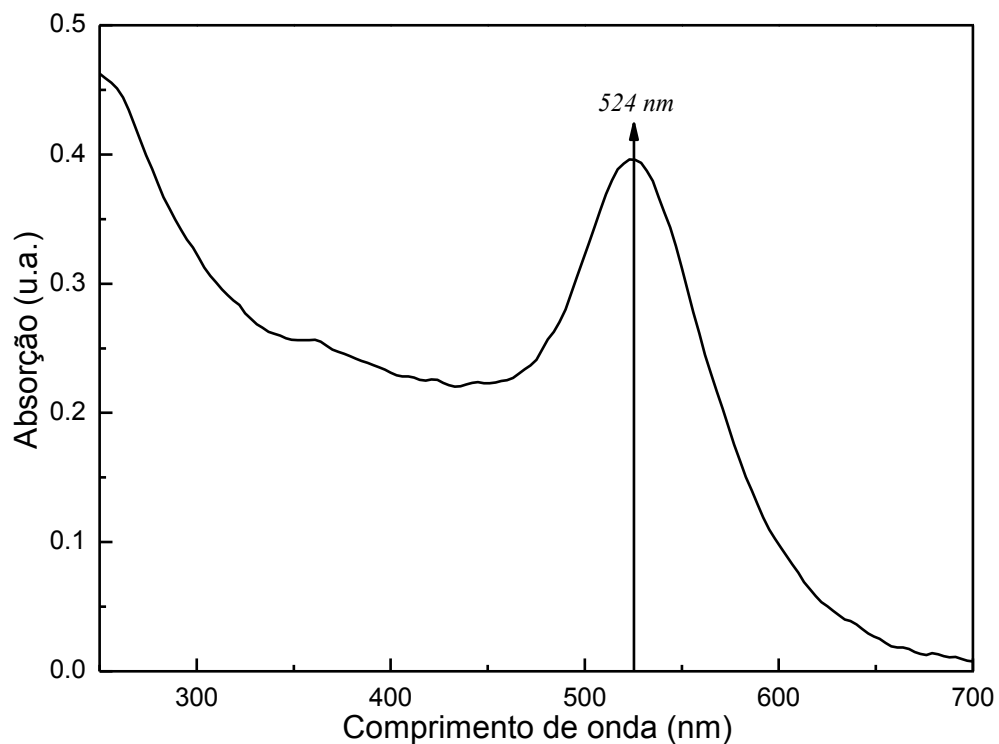
4. RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os resultados após a síntese de AuNps, os espectros das caracterizações da amostra de Ce6-AuNps e a resposta dos ensaios de Fluorescência e citotoxicidade.

4.1.As Nanopartículas de ouro

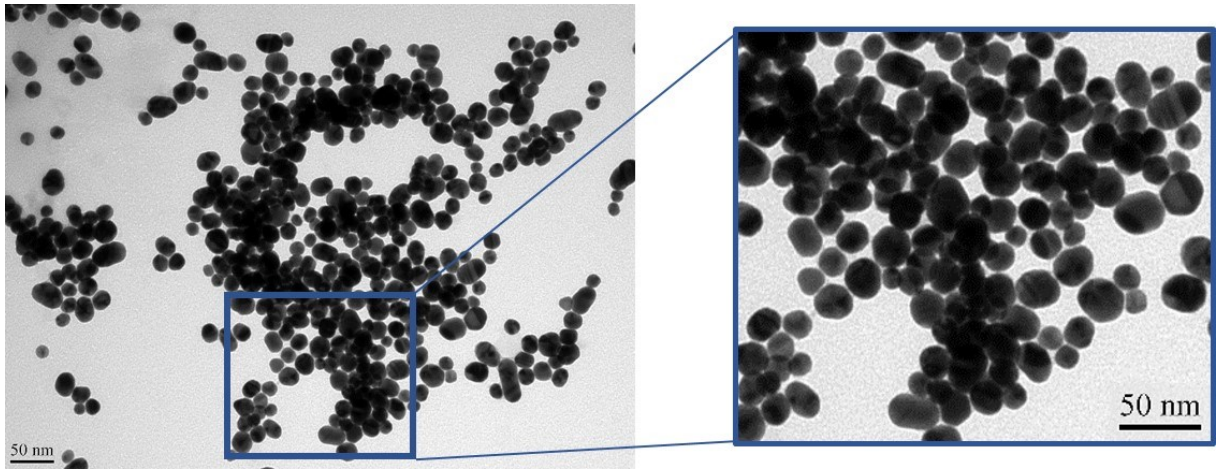
A Figura 25 mostra o espectro de absorção das AuNps sintetizadas, em que é possível verificar a banda de ressonância plasmônica centrada em 524 nm, que é característico de uma solução coloidal de AuNps.

Figura 25: Espectro de UV-visível das AuNps.



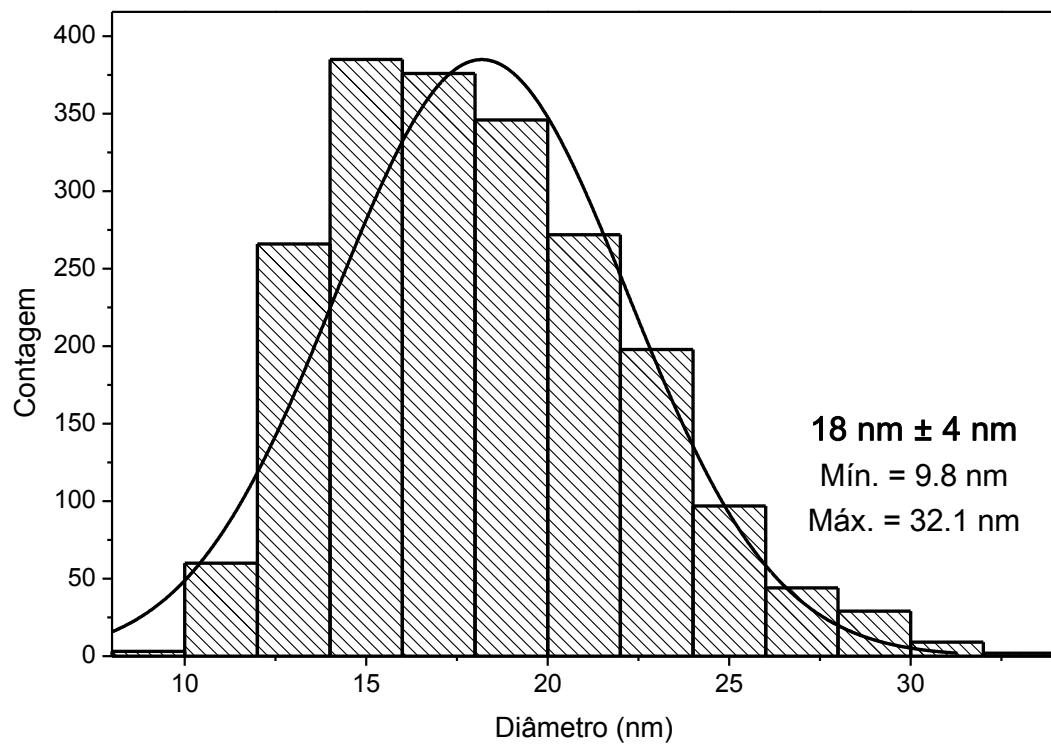
O tamanho e formato das AuNps são mostrada nas micrografias de MET da Figura 26. Os resultados mostram heterogeneidade de tamanhos e formatos, com geometrias circulares e bastões, mas em relação à escala de tamanho pode-se observar que elas são menores que 50 nm.

Figura 26: Micrografias por MET de AuNps.



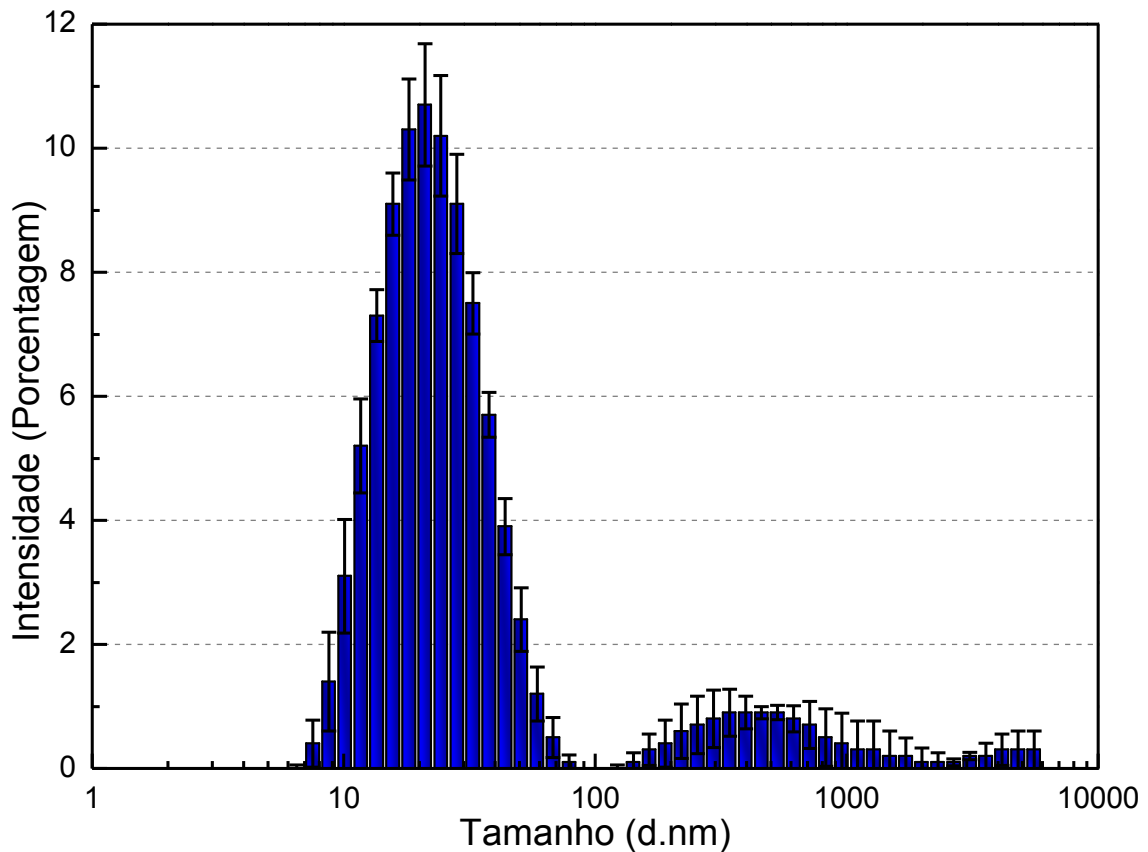
A partir dessas imagens foi calculada a distribuição média de tamanhos das Nps, que é mostrado na Figura 27. O histograma mostra que a maior contribuição está na da faixa de 15 nm a 20 nm com diâmetro médio de 18 ± 4 nm.

Figura 27: Gráfico de distribuição de tamanho das AuNps obtidas por MET.



A distribuição de tamanho das AuNps foi mensurada também via DLS, como mostra a Figura 28. A faixa de maior contribuição de tamanho é similar às análises de MET, levando em consideração as diferenças entre as técnicas. Outro ponto importante é a presença de aglomerados de Nps da ordem de 400 nm.

Figura 28: Intensidade das distribuições de tamanho de AuNps obtidas por DLS.



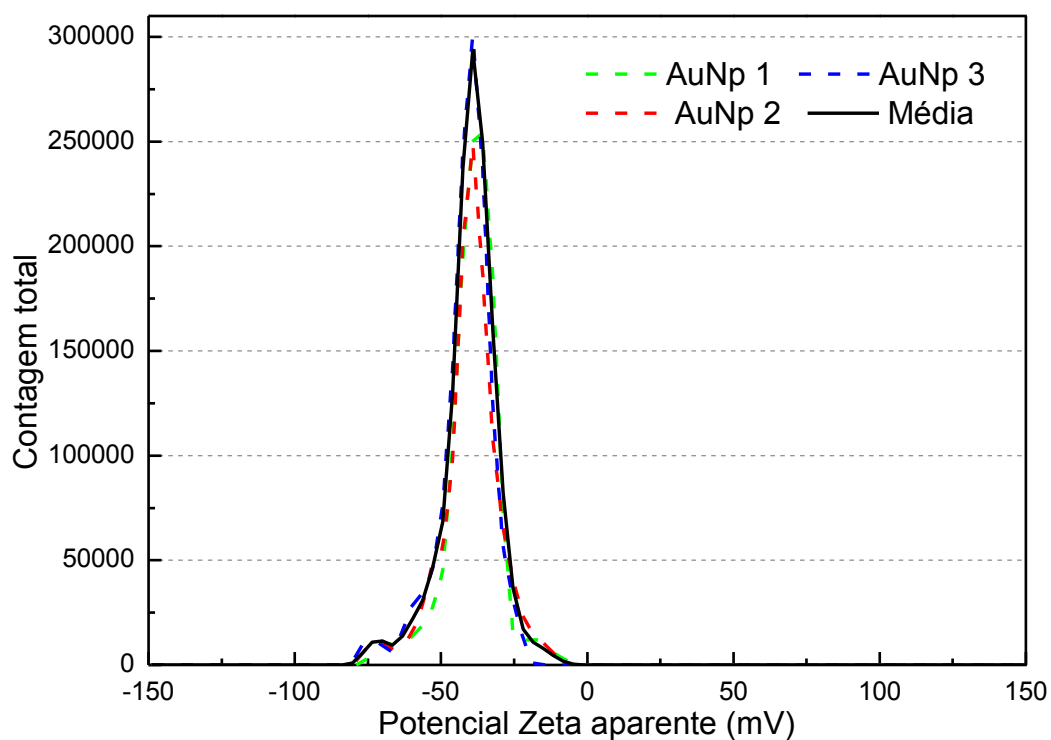
A Tabela 2 mostra os resultados obtidos pelas técnicas de MET e DLS.

Tabela 2: Comparação entre as medidas do diâmetro pelas técnicas de MET e DLS.

MET	DLS
(nm)	(nm)
18±4	21,11±0,65

O potencial Zeta da amostra de AuNps foi medido em triplicata e o gráfico do potencial pela contagem é mostrado na Figura 29.

Figura 29: Potencial Zeta das amostras de AuNps em triplicata e a média.



Por meio dos dados obtidos pelo potencial Zeta, foi possível coletar as seguintes informações apresentadas na Tabela 3. O valor do potencial médio é bastante promissor, pois é menor -30 mV indicando que a solução coloidal é estável.

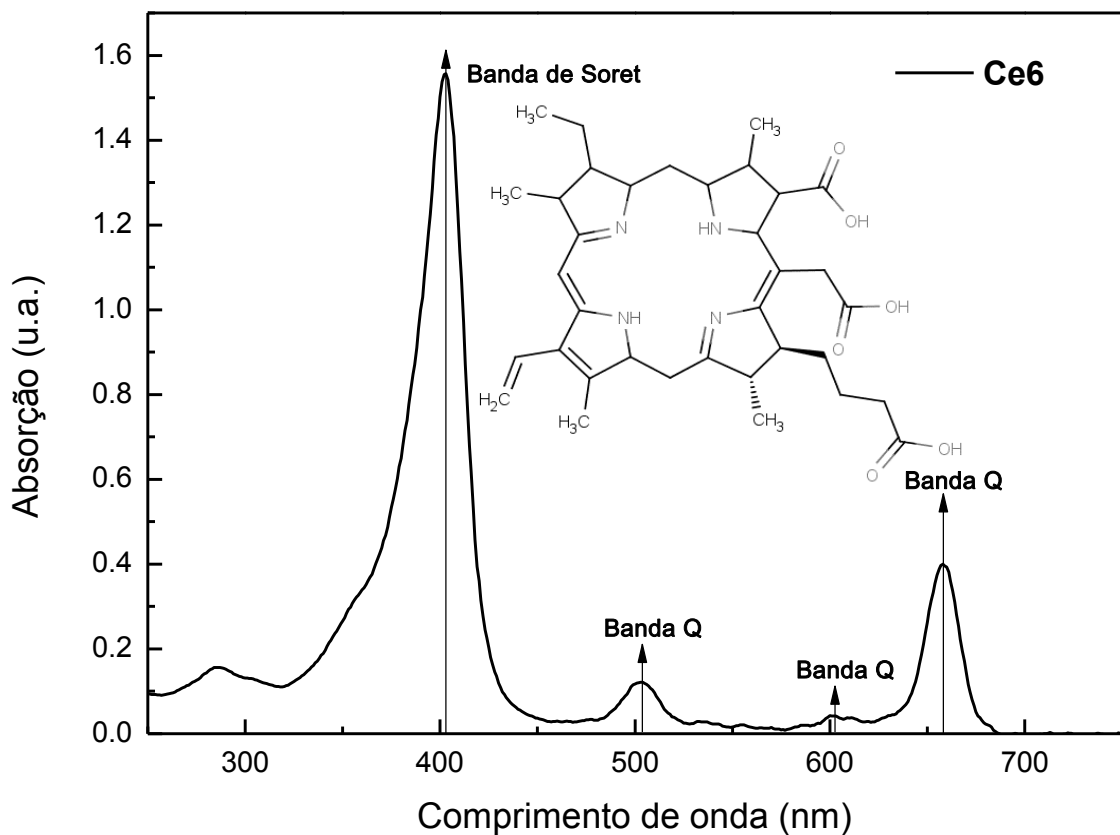
Tabela 3: Dados obtidos pelo potencial Zeta das AuNps.

	T (°C)	Potencial Zeta (mV)	Mobilidade ($\mu\text{mcm/Vs}$)	Condução (mS/cm)
	20,0	-39,7	-2,813	1,55
	20,1	-40,6	-2,878	1,67
	20,0	-44,3	-3,139	1,75
Média	20,0	-41,53	2,943	1,65

4.2. Clorina e6

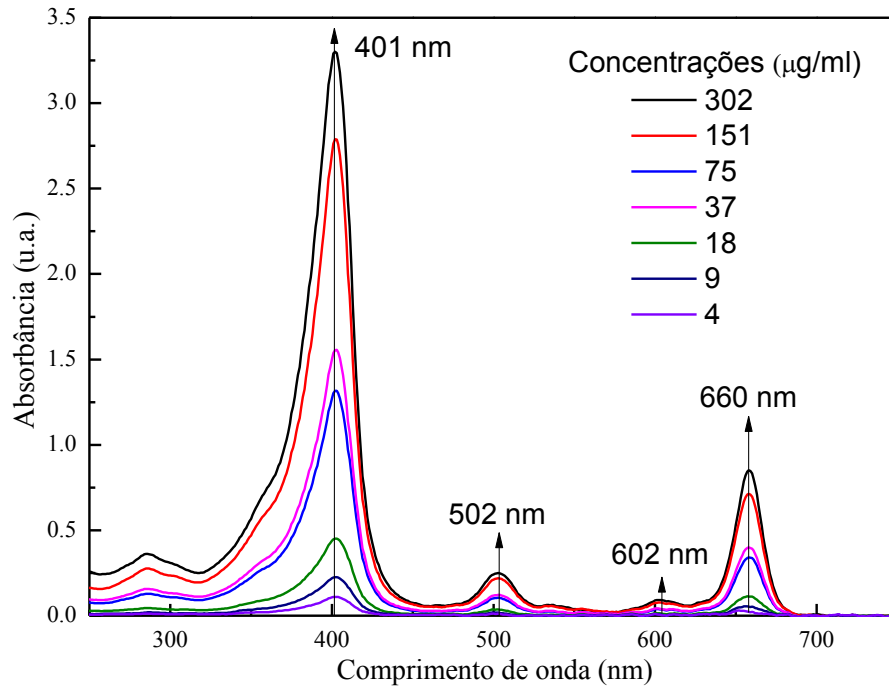
O espectro de UV-vis da solução de Ce6 é mostrado na Figura 30. Este resultado é de grande importância, pois possibilita a análise da integridade do FS. Neste espectro estão presentes a banda de Soret, na região de 401 nm e as 3 bandas Q, nas regiões, 502 nm, 602 nm e 660 nm, respectivamente.

Figura 30: Espectro de UV-vis da Ce6.



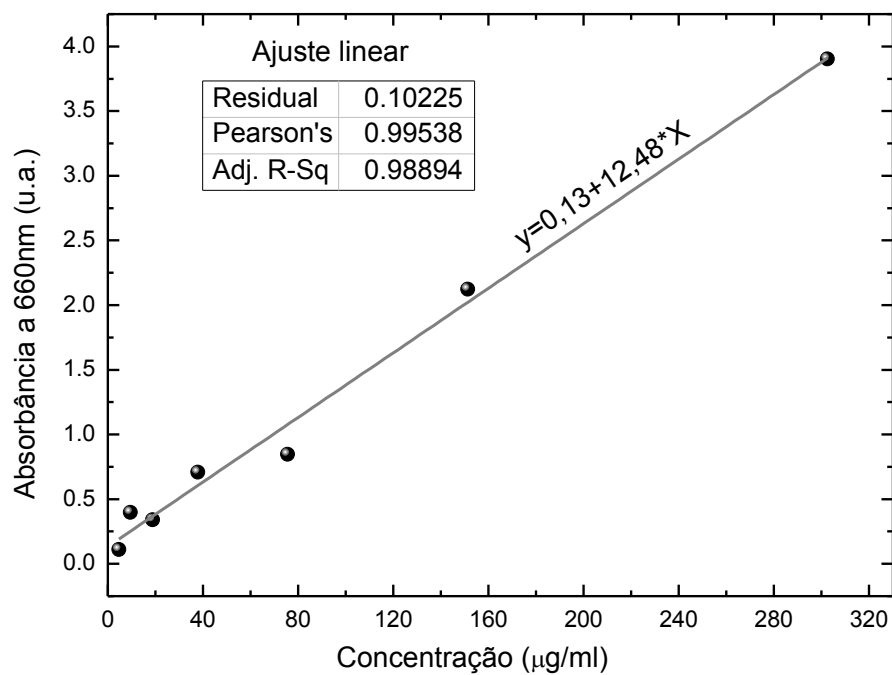
O controle da concentração de Ce6 para aplicação em cultura de células é de extrema importância. Assim, o espectro de absorção de onze diluições foram feitas para determinar a concentração versus absorção, como mostra a Figura 31. A banda de 660 nm foi escolhida para determinar esta correlação, apesar da banda na região de 400 nm apresentar uma forte absorção, pois se trata de uma região em que não há interferência de outras absorções, ou seja, é a região da janela terapêutica.

Figura 31: Espectro de UV-vis das diluições da solução de Ce6.



Por meio dos espectros das diluições da Ce6 foi possível comparar as bandas de absorção por concentração, conforme mostrado na Figura 32. A correlação linear nesta faixa possibilita o uso da equação da reta ajustada para o cálculo da concentração.

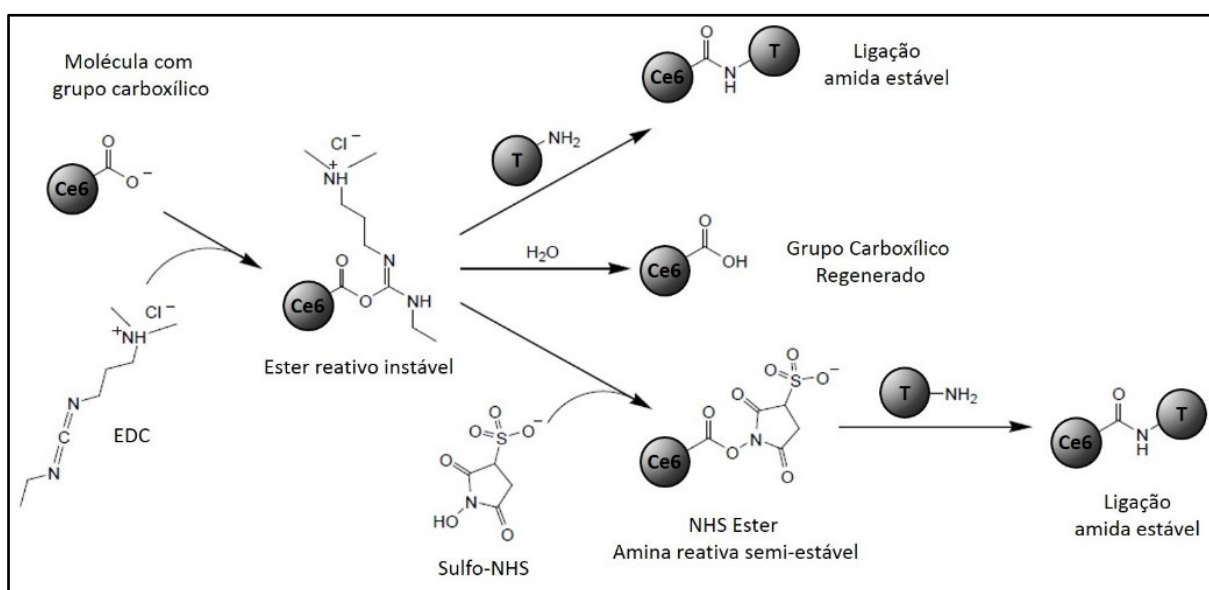
Figura 32: Gráfico de calibração da concentração versus absorção.



4.3. Funcionalização da Clorina e6 à Tiouréia

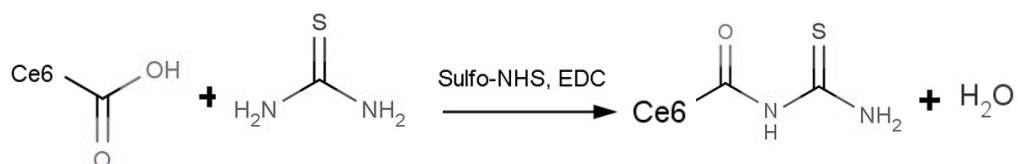
A reação entre a Ce6 e a tiouréia passou por várias etapas, em que os reagentes EDC e sulfo-NHS tiveram participação para que o produto final obtivesse um alto rendimento. As etapas são mostradas na Figura 33.

Figura 33: Etapas da reação entre a Ce6 e a tiouréia.



Após a síntese, a reação global da reação é apresentada na Figura 34, em que há a formação do ligante intermediário e a liberação de uma molécula de água.

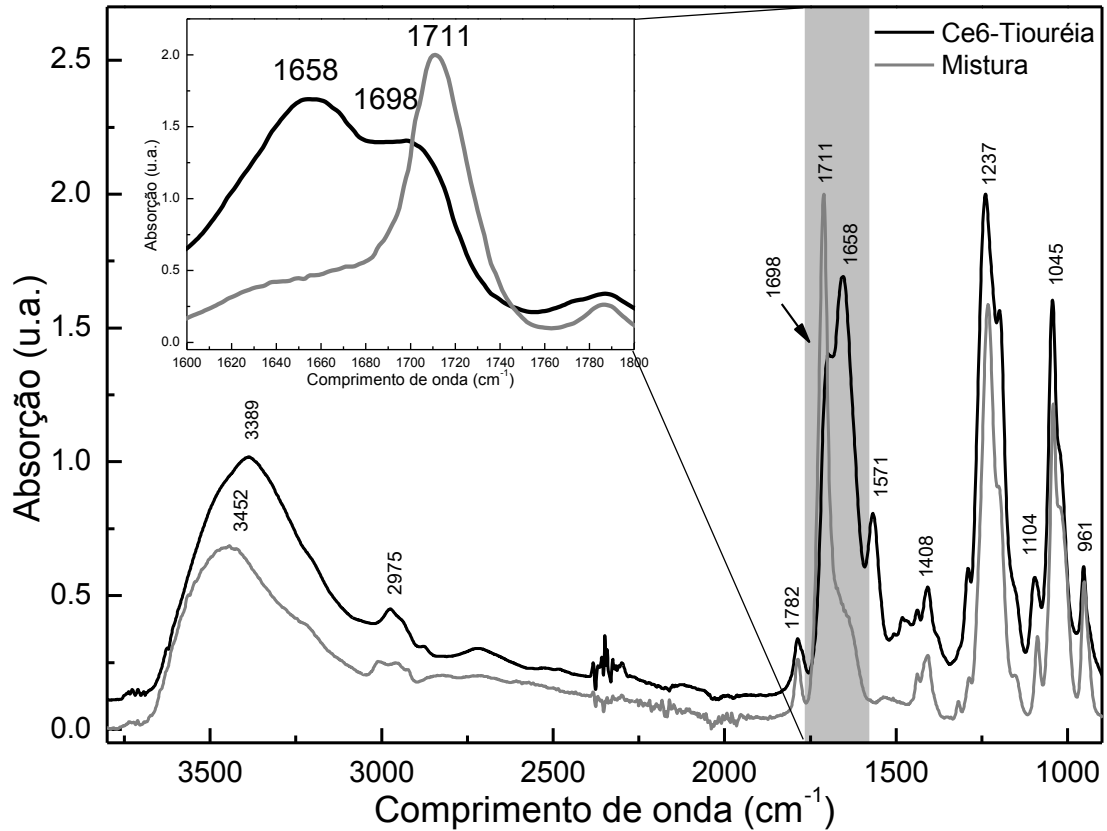
Figura 34: Reação carbodiimida entre a Ce6 e a tiouréia.



A confirmação do processo de funcionalização foi realizada pela caracterização da amostra por FT-IR, em que foram selecionadas duas metodologias: 1) amostra funcionalizada utilizando o protocolo descrito no item 3.5 e 2) amostra contendo os reagentes misturados na mesma proporção da amostra da metodologia 1. A Figura 35, mostra os espectros da Ce6-

tiouréia. Os espectros das amostras são similares, mas algumas bandas mostraram diferenças de intensidade e formato, que serão explicadas na discussão dos resultados.

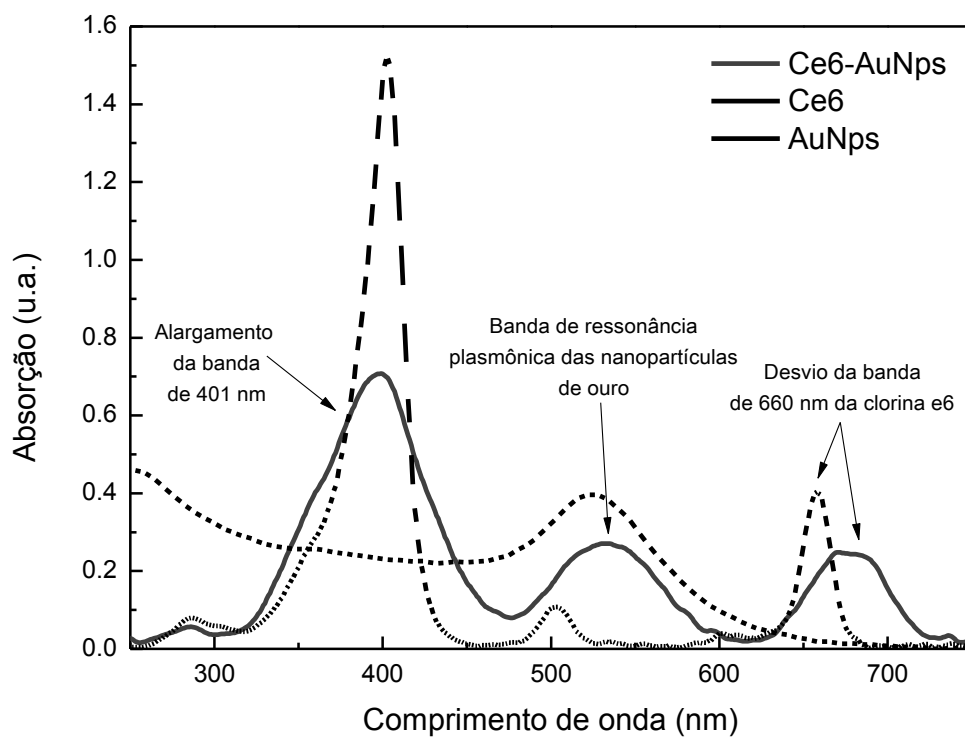
Figura 35: Espectro de FT-IR das amostras de Ce6-tiouréia.



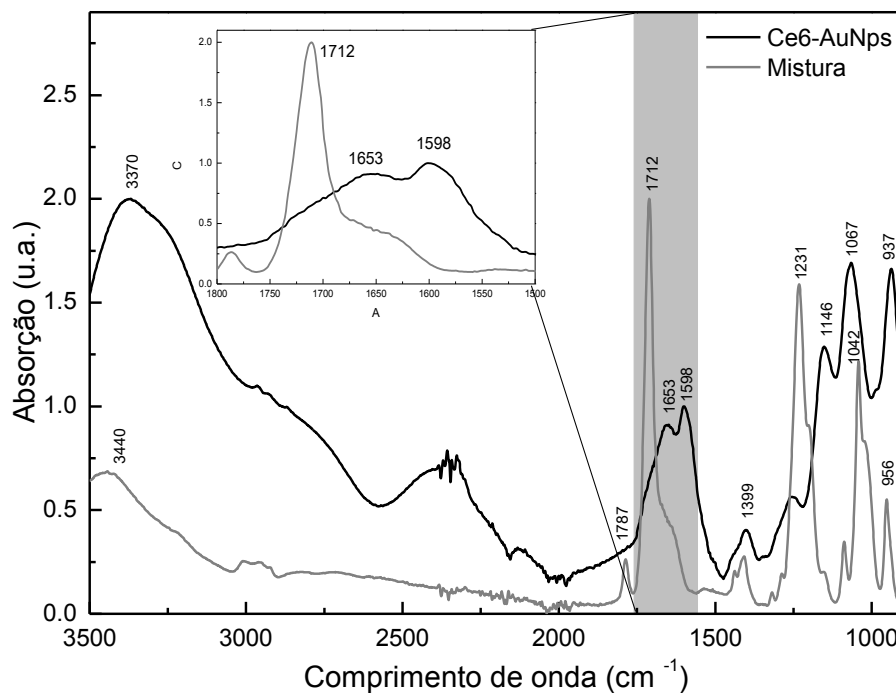
4.4. Funcionalização às AuNps

Após a funcionalização às AuNps, e o processo de purificação, o espectro da amostra foi coletado, conforme a Figura 36. O espectro da amostra funcionalizada mostra uma sobreposição de espectros de absorção somados, indicando que o processo foi feito com sucesso.

Figura 36: Espectro de UV-vis da amostra de Ce6-AuNps.



O espectro de FT-IR também foi coletado para a amostra Ce6-AuNps, mostrado na Figura 37. A caracterização das bandas e a diferença da presença de AuNps serão discutidas na seção a seguir.

Figura 37:Espectro de FT-IR das amostras de Ce6-tiouréia e a mistura dos reagentes.

A atribuição das bandas presentes na Figura 41 e 43 foram reunidas na Tabela 4.

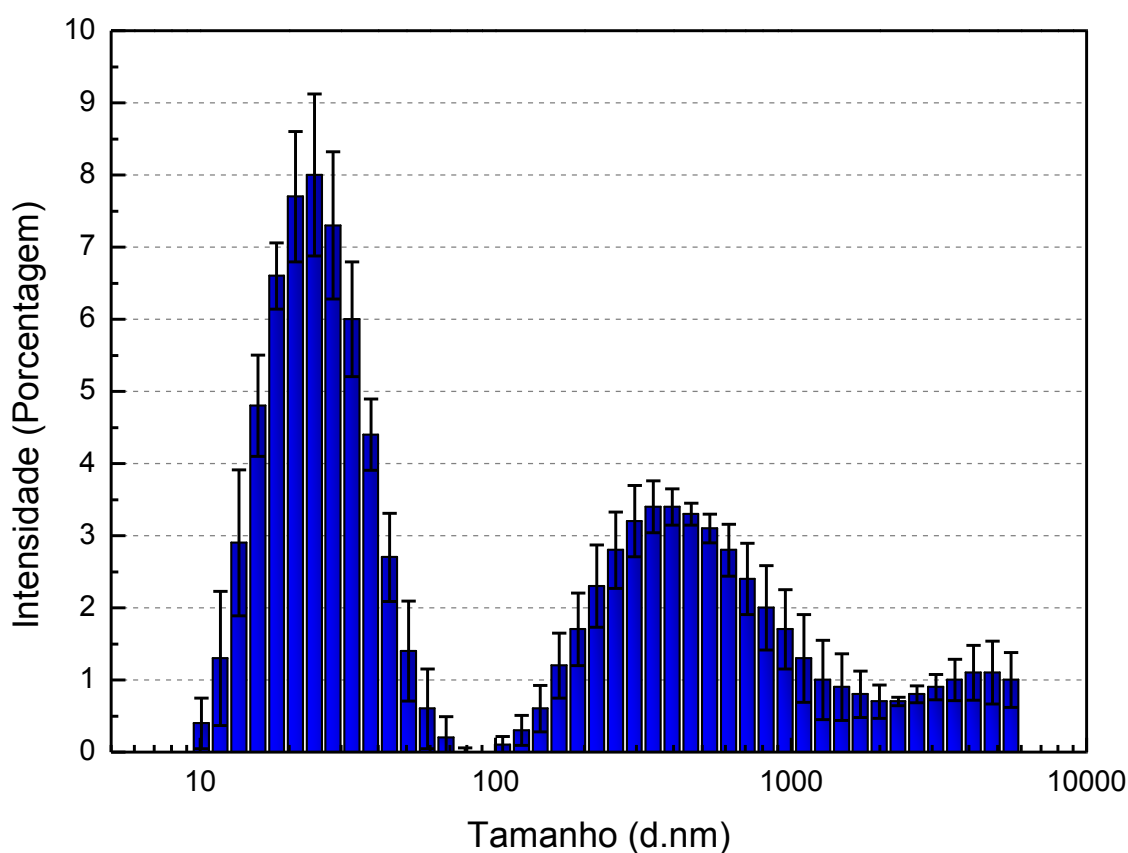
Tabela 4: Tabela de atribuição dos modos vibracionais.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Modo Vibracional	Referência
3500-2800	str N-H	(NAUMAN ,2000;
	str O-H	CHENG, 2005)
3100-2800	str CH_3	(JOSEPH,1987;
	str CH_2	NAUMAN ,2000)
	str CH	
1785-1710	str C=O	(CHENG, 2005; GLADKOVA, 2010)
1572-1548	Str NH_2	(NAUMAN ,2000)
1400-1310	COO^-	(JOSEPH,1987)
1450-1375	CH_3	(NAUMAN ,2000)
1067-1045	C=S	(JOSEPH,1987;)

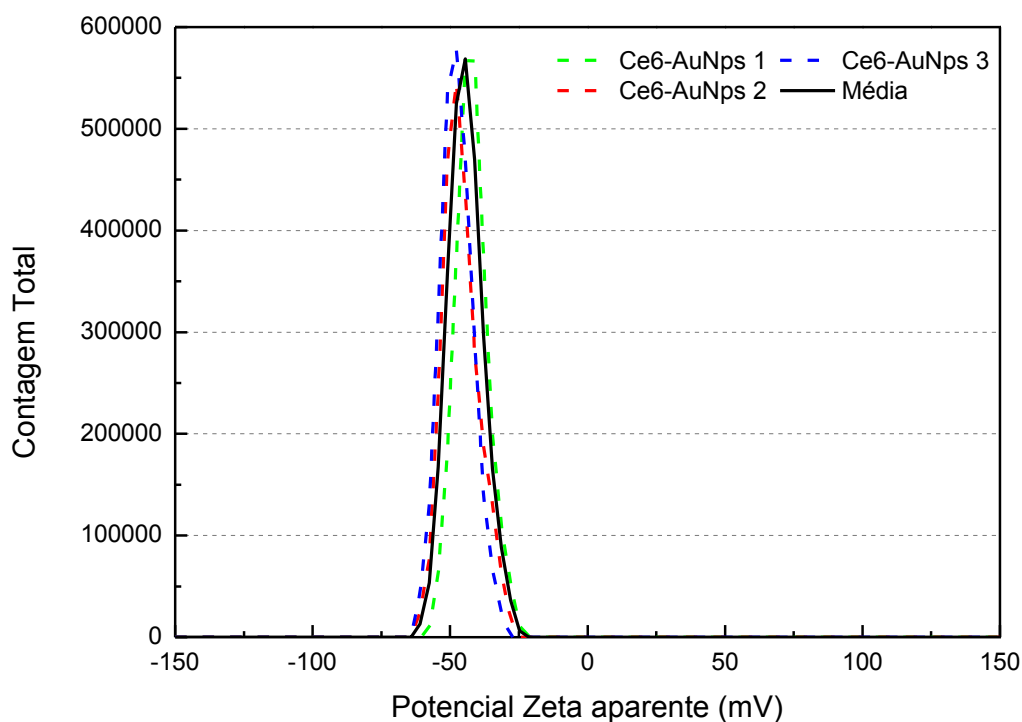
Str =alongamento

As técnicas de potencial Zeta e DLS também foram utilizadas para caracterizar o novo FS formado, e os resultados são mostrados na Figura 38 e 39, respectivamente. Os resultados da técnica de DLS mostram variação do diâmetro hidrodinâmico em relação as Nps sintetizadas. O resultado do potencial Zeta permite a análise da estabilidade do complexo Ce6-AuNps.

Figura 38: Intensidade das distribuições de tamanho de Ce6-AuNps.



Após todos os processos de funcionalização e o processo de purificação, uma análise de potencial Zeta foi realizada para a determinação da estabilidade do complexo formado, como mostra a Figura 39.

Figura 39: Potencial Zeta das amostras de Ce6-AuNps em triplicata

Os dados da Figura 39 foram reunidos e são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5:Dados obtidos pelo potencial Zeta das Ce6-AuNps.

	T (°C)	Potencial Zeta (mV)	Mobilidade ($\mu\text{mcm/Vs}$)	Condução (mS/cm)
	24,8	-42,2	-3,305	1,06
	25,0	-44,9	-3,520	1,11
	25,1	-45,8	-3,588	1,15
Média	24,9	-44,3	-3,47	1,06

A amostra possui potencial zeta fora da faixa de soluções insatáveis.

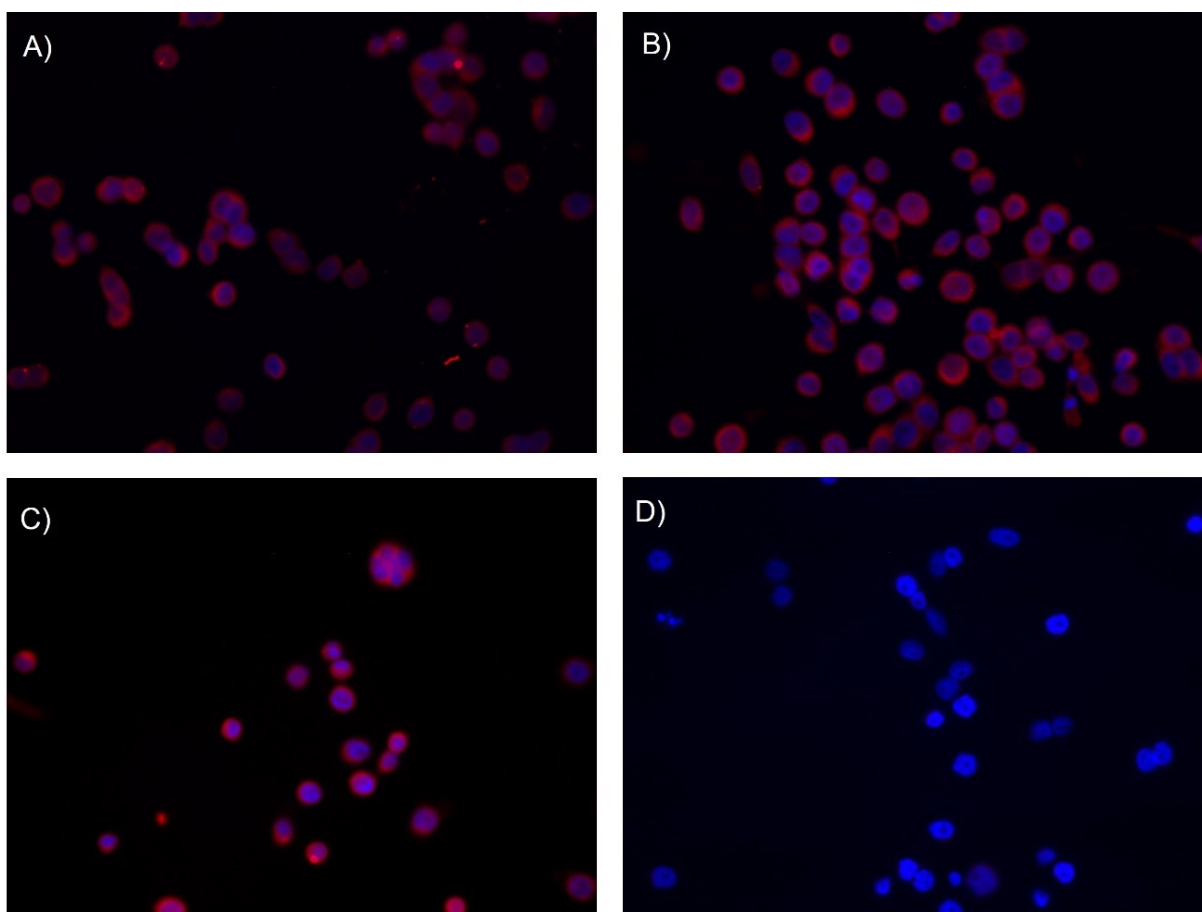
4.5.Ensaio de Fluorescência

O Ensaio de fluorescência da amostra de Ce6 foi realizado para determinação do tempo de incubação do FS. A Tabela 6, mostra como os grupos foram divididos e o tempo de incubação para os mesmos.

Tabela 6: Relação entre os grupos e o tempo de incubação.

Grupos	Tempo de Incubação com a Ce6
Grupo I	Incubação por 2 horas
Grupo II	Incubação por 4 horas
Grupo III	Incubação por 8 horas
Grupo IV	Grupo controle

A Figura 40 mostra as imagens de A) grupo I, B) grupo II, C) grupo III e D) grupo IV.

Figura 40: Imagem de Fluorescência das células MDA-MB 468. A) Grupo I B) Grupo II e C) Grupo III.

Por meio do software ImageJ as imagens de microscopia por fluorescência foram analisadas e a intensidade de fluorescência para cada grupo foi calculada utilizando método RGB, conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Intensidade da fluorescência das células incubadas com a Ce6 por 2, 4 e 8 horas, obtidas pela determinação da intensidade do brilho dos pixels

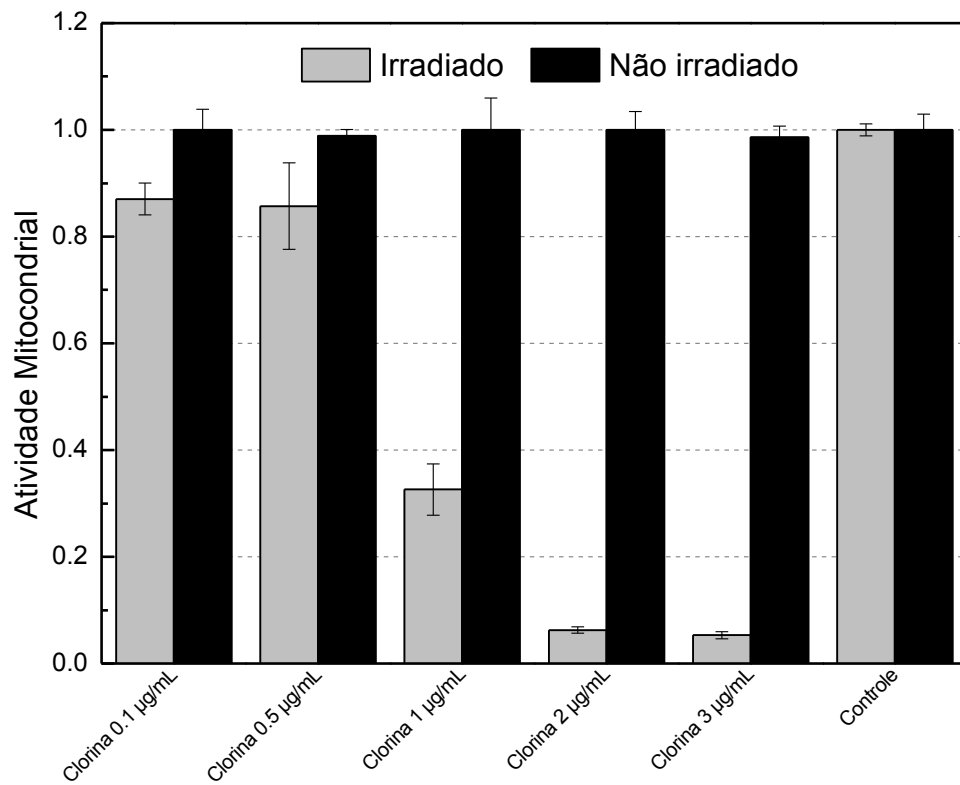
Figura	Tempo de Incubação	Medida RGB		
		Vermelho Red	Azul Blue	Razão (V/A ou R/B)
A-Grupo I	2 horas	9.2995	12.055	0.789194
B-Grupo II	4 horas	12.2655	10.732	1.462278
C-Grupo III	8 horas	7.049	4.606	1.504967
D-Grupo IV	Controle	5.5865	24.6905	0.232773

Analisando os dados obtidos pelas imagens pode-se notar que a Ce6 não está acumulada em uma área específica do citoplasma, pois a distribuição da fluorescência é homogênea, e que o tempo ideal para a captação do FS é de 4 horas.

4.6. Ensaio de Viabilidade Celular

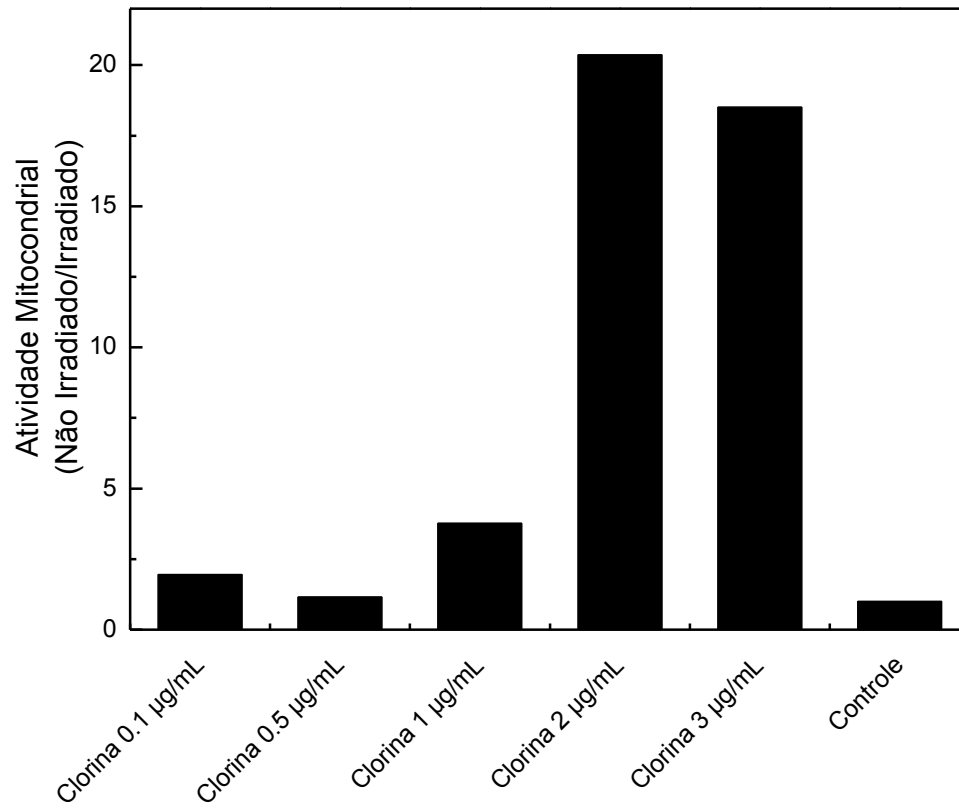
Após a determinação do tempo de incubação da Ce6, foram realizados os ensaios de viabilidade celular para determinação da dose de FS a ser utilizada. Para o mesmo, 5 doses de Ce6 foram testadas, com e sem irradiação. A Figura 41 mostra a atividade mitocondrial da cultura de células em função da dose de Ce6, por meio do teste de MTT.

Figura 41: Ensaio por MTT de diferentes concentrações de Ce6.



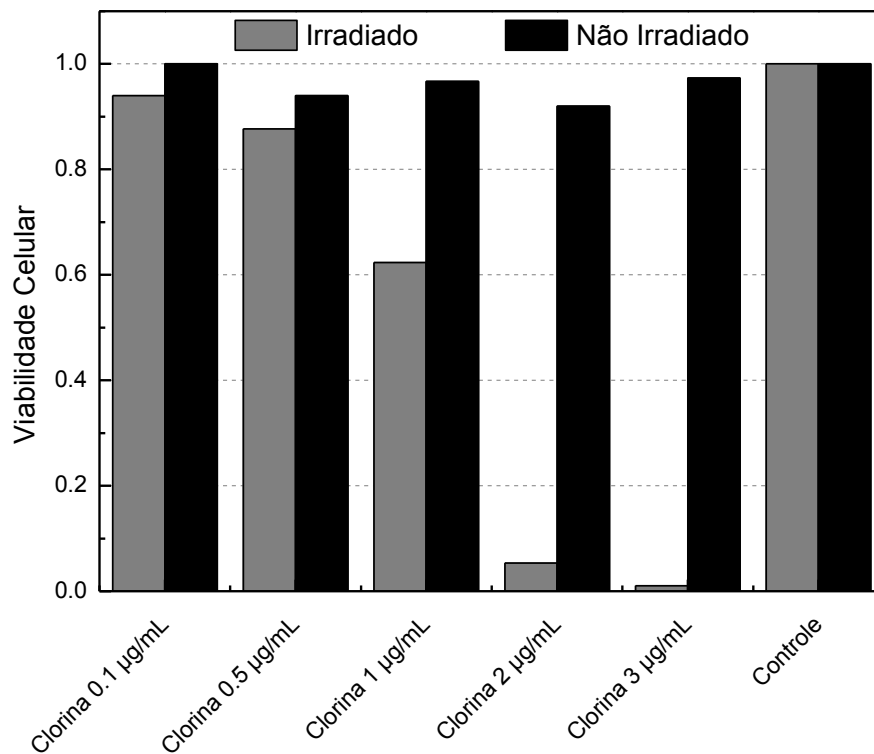
A proporção entre a atividade mitocondrial com e sem irradiação é mostrado na Figura 42 para as cinco doses estudadas além do controle.

Figura 42: Relação entre os grupos irradiados e não irradiados do teste por MTT.

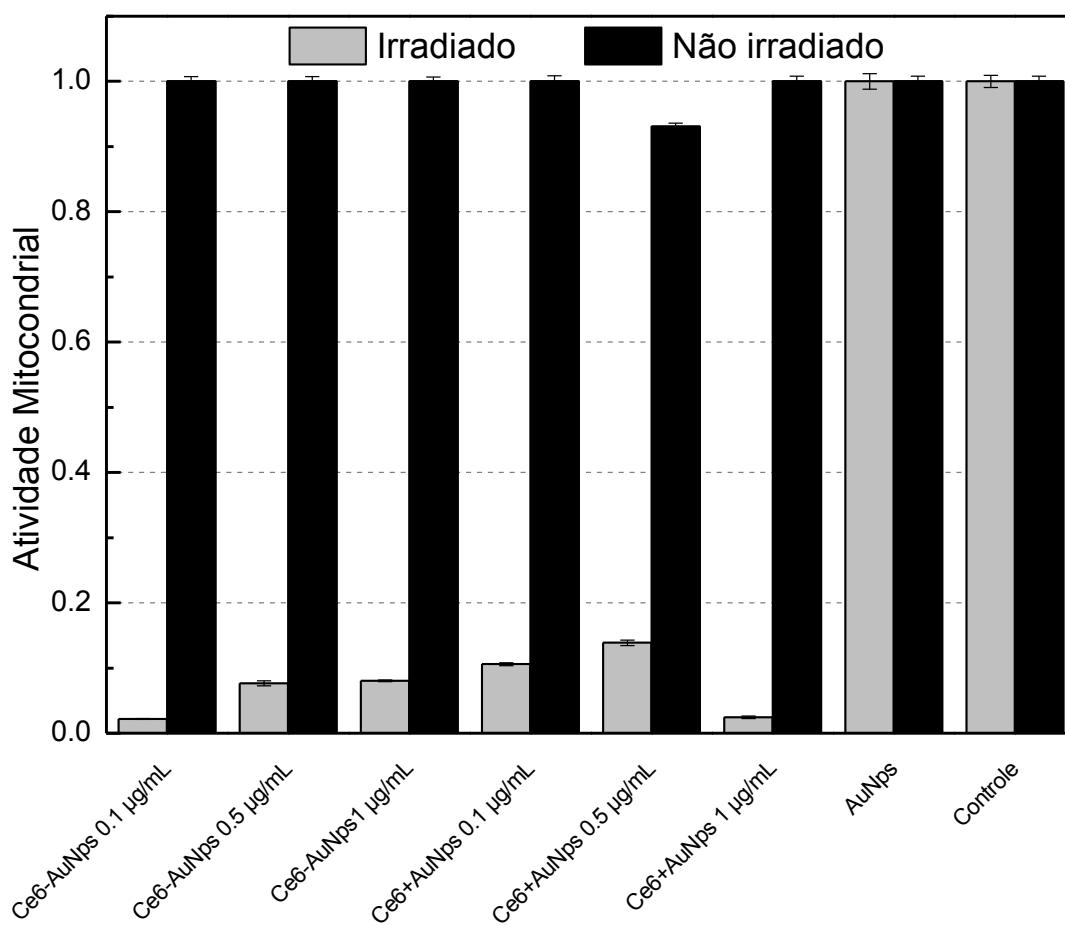


A fim de avaliar a viabilidade celular, um ensaio de Azul de Tripán foi realizado, nas mesmas condições do que o teste de MTT, e os resultados são mostrados na Figura 43.

Figura 43: Ensaio por Azul de Tripán de diferentes concentrações de Ce6.

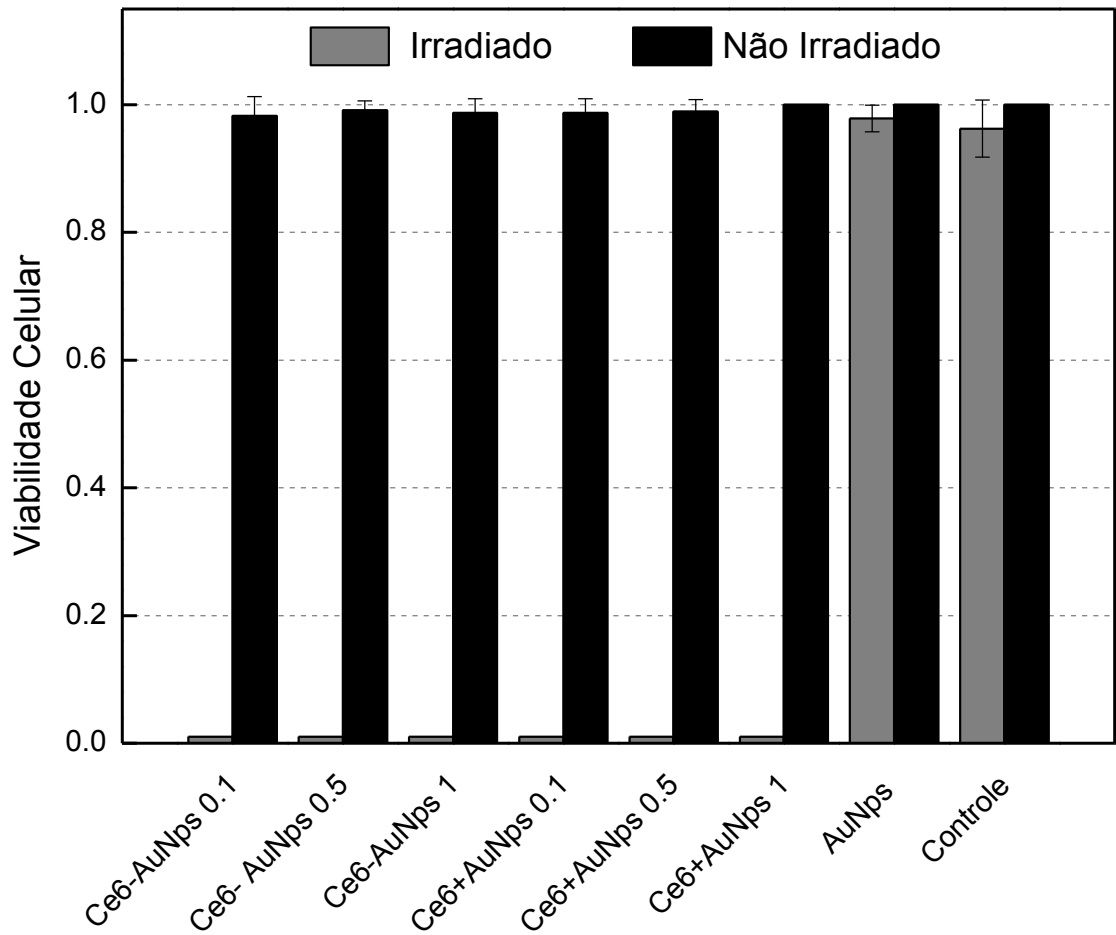


Após a determinação da possível dose do novo FS dois grupos de amostra foram testados novamente, o novo FS de Ce6-AuNps, e a mistura não funcionalizada de Ce6 com AuNps, chamado de Ce6+AuNps. A Figura 44 mostra o gráfico do teste por MTT para os grupos de 0,1 µg/mL 0,5 µg/mL e 1 µg/mL da amostra de Ce6-AuNps, e 0,1 µg/mL 0,5 µg/mL e 1 µg/mL da amostra de Ce6+AuNps, além de um grupo com apenas AuNps e o grupo controle. Estes grupos foram expostos ou não a irradiação.

Figura 44: Teste colorimétrico MTT.

Para os ensaios de viabilidade celular foi realizado o teste de Azul de Tripan. Na Figura 45, são mostrados os grupos de 0,1 µg/mL 0,5 µg/mL e 1 µg/mL da amostra de Ce6-AuNps, e 0,1 µg/mL 0,5 µg/mL e 1 µg/mL da amostra de Ce6+AuNps, além do grupo controle com somente AuNps e as células. Para avaliar a ação fotodinâmica, estes grupos divididos em irradiados e não irradiados.

Figura 45: Teste de coloração por Azul de Tripán.



Os grupos que foram testados mostraram diferença entre a viabilidade celular e a atividade mitocondrial sem e com a presença de AuNps, indicando que a sua presença interfere na eficiência do FS.

5. DISCUSSÃO

Nesta seção foram abordadas as discussões dos resultados apresentados na seção anterior.

5.1. As Nanopartículas de ouro

A solução coloidal de AuNps foi sintetizada por meio da rota “Bottom up” utilizando citrato de sódio, sendo descrita pela primeira vez por Turkevich. (TURKEVICHTH, 1951). A proporção entre o número de mols do sal de ouro e citrato de sódio foi fixada em 1:16, baseando-se em dados da literatura. Nguyen e colaboradores (2010) fizeram um estudo controlando esta proporção para sintetizar AuNps com distribuição uniforme de tamanho. (NGUYEN, 2010) Enquanto, Ji e colaboradores (2007) produziram AuNps com diferentes tamanhos variando a relação molar de citrato de sódio e o pH da solução, mantendo a concentração inicial do sal de ouro constante. (JI, 2007) Portanto, a proporção entre estes reagentes permite controlar a distribuição de tamanho das Nps, morfologia e também a estabilidade coloidal.

No processo de formação das AuNps ocorre uma nucleação rápida dos átomos de ouro em um arranjo cristalino. Esta semente serve de ponto de partida para o crescimento controlado das nanoestruturas, por meio dos átomos de ouro livres na solução. Se a camada passivante for suficientemente forte, as Nps se estabilizam e o crescimento é cessado. (GORUP, 2010, NGUYEN, 2010) Nguyen e colaboradores (2011) analisaram sistematicamente o crescimento de AuNps pelo método mediado por sementes. Eles descobriram que na primeira fase da síntese, período de formação da semente, a maior parte do precursor de ouro é consumido, porém ao adicionar gradativamente a concentração de HAuCl_4 , ocorre a fase de crescimento, em que o diâmetro médio das partículas aumenta proporcionalmente. (NGUYEN, 2011) Assim, o citrato de sódio desempenha duas funções na reação, o de agente redutor e de agente estabilizante, o que garante um meio reacional homogêneo.

Após o término da síntese, a solução possuía coloração característica de um colóide de ouro, como mostrado na Figura 21 d. Esta coloração característica está relacionada a banda de ressonância plasmônica em 524 nm, mostrada no espectro de absorção, na região do verde do espectro visível (Figura 25). O fato de possuir apenas uma banda de absorção indica que as

AuNps possuem geometria aproximadamente esférica, pois há somente um modo de oscilação dos plasmons superficiais. (NAVARRO, 2013) O valor máximo de absorção encontrado no espectro está correlacionado ao número de AuNps formadas na solução, ou seja, quanto maior o número de Nps maior será o valor de intensidade de absorção. Amendola e colaboradores (2009) encontraram concordância entre os dados experimentais e teóricos e relataram que é possível determinar a concentração de AuNps diretamente por meio dos espectros de UV-vis. Eles apresentaram, em detalhes, um método para estimar a concentração por espectroscopia de UV-vis, com base na montagem de espectros experimentais baseados nos modelos de Mie e Gans. (AMENDOLA, 2009)

Na Figura 25, o valor de intensidade da banda de ressonância foi de 0,39, que segundo a Lei de Lambert Beer, a concentração da solução é dependente do valor da intensidade de absorção, do caminho óptico e do coeficiente de extinção das Nps. (LE RU E ETCHEGOIN, 2008) O coeficiente de extinção foi calculado pela Equação 7, de Navarro e colaboradores (2013), sendo de $1,73 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (NAVARRO, 2013) Então, utilizando a Equação 8, a solução coloidal sintetizada tem um valor de concentração de $1,35 \times 10^{12}$ AuNps por mL. Le Ru e Etchegoin também utilizaram a lei de Labert-Beer para calcular a concentração de AuNps com tamanho de aproximadamente, 20 nm, sintetizadas pelo método de redução por citrato de sódio, e encontraram um valor de $1,2 \times 10^{11}$ partículas/ mL. (LE RU E ETCHEGOIN, 2008) Portanto, a proporção utilizada de 1:16 possibilitou uma concentração maior de nanopartículas.

Este tipo de síntese promove AuNps com camada superficial que pode ser facilmente modificada por adsorção de outras moléculas. Na comunidade científica há relatos de associação a grupos funcionais tais como tiol (-SH) (ARYAL, 2006), hidroxila (-OH) (YOO, 2009), fosfina (-PH₂) (SHEM, 2009) e amino (-NH₂) (DING, 2006; PORTA, 2008). Dentre eles, os grupos funcionais mais eficazes para esta ligação referem-se aos grupos que contêm enxofre, pois oferecem uma forte conjugação devido a uma ligação covalente Au-S. Normalmente, os ligantes que contêm enxofre são alquiltióis (GOREN, 2006; JIMENEZ, 2004; DU, 2005), dendrímeros (CHECHIK E CROOKS, 1999), fosfolipídios (HE E URBAN, 2005), peptídeo, polipeptídios e seus derivados tiolados (ZHOU, 2007; NAKA, 2007; GHOSH, 2008; AILI, 2008) e de nucleotídeos modificados por tiol ou sulfureto (HURST, 2006; MILLSTONE, 2008B).

A estabilidade da solução de AuNps foi avaliada pelo potencial Zeta (Tabela 3). Esta técnica avalia o grau de estabilidade das Nps levando em consideração as cargas superficiais e o solvente. A estabilidade das Nps depende diretamente da força do agente estabilizante, se a

solução é cineticamente estável, o agente estabilizante é eficiente. Valores entre -30 mV e 30 mV são considerados próximos do ponto isoelétrico, ou seja, faixa de instabilidade coloidal pois não há forças capazes de evitarem a aglomeração das Nps. (GORUP, 2010) Assim o valor de -41,53 mV encontrado para a solução de AuNps indica que a síntese realizada possui boa estabilidade química. Este valor encontrado corrobora com os experimentos de Riabinina e colaboradores (2012), que avaliaram as mudanças de potencial Zeta alterando o tamanho das AuNps de 3 a 13 nm, e descobriram que o valor do potencial Zeta de AuNps permanece entre -100 mV a 10 mV, mesmo alterando a concentração da solução e a natureza do solvente com NaOH ou HCL (RIABININA, 2012).

A visualização da morfologia das partículas foi realizada a partir das micrografias de MET (Figura 26). Os resultados mostram heterogeneidade de tamanhos e formatos, fator dependente dos parâmetros de síntese, como proporção dos reagentes, temperatura e agitação. As geometrias observadas das Nps vão de esferas a bastões. Analisando as imagens por meio do programa ImageJ foi possível construir um histograma (Figura 27), em que é relacionado o tamanho das Nps pelo número de partículas contabilizadas. A maior incidência dos tamanhos está no intervalo de 15 a 20 nm, e o diâmetro médio encontrado foi de 18 ± 4 nm. Estes dados levam em conta uma amostragem de 30 imagens.

As imagens de MET fornecem informações importantes sobre a geometria, plano cristalino e tamanho das Nps, porém a camada passivante não pode ser vista, sendo necessária outras técnicas de caracterização visto sua importância na vida útil das AuNps. Assim, os resultados de MET foram confrontados com os resultados obtidos pela técnica de DLS. O histograma de distribuição de tamanho por esta técnica indica um diâmetro médio de 22,4 nm. Neste histograma também é possível notar uma distribuição bimodal em que há registro de Nps com tamanhos maiores, de aproximadamente 400 nm. Este fato está relacionado com as partículas que sofreram aglomeração por carência da camada passivante, porém a quantidade de partículas maiores é desprezível em relação ao número de partículas na região de 15 a 30 nm.

Khlebtsov e colaboradores afirmam que a técnica de DLS pode determinar a distribuição do tamanho das AuNps com uma variação de 1 a 100 nm. Partículas não esféricas com tamanhos maiores que 30-40 nm podem dificultar a identificação de Nps menores, dando resultados diferentes da MET. Porém eles afirmam que, atualmente, o método DLS é o único instrumento adequado para o diagnóstico sensível de processos de agregação. (KHLEBTSOV, 2011) Jans e colaboradores utilizaram a técnica de DLS para monitorar o tamanho hidrodinâmico das AuNps funcionalizadas a proteínas. Neste estudo, eles demonstram que a

técnica por DLS pode ser utilizada como uma ferramenta poderosa, sendo conveniente para o estudo da bioconjugação de ligações biomoleculares e AuNps. Eles também demonstram que por DLS, a ligação entre uma sonda, formada por AuNps e proteínas, e uma molécula alvo podem ser medidas diretamente e quantitativamente em uma solução. (JANS, 2009) As técnicas de DLS e MET se complementam, visto que a MET fornece dados do diâmetro real das Nps e a técnica de DLS o diâmetro hidrodinâmico.

Após realizar as técnicas de caracterização das AuNps foi possível notar que após a repetição dos procedimentos de síntese há uma boa reprodutibilidade de resultados, levando em consideração a boa distribuição de tamanhos e estabilidade da solução coloidal.

5.2. Clorina e6

O espectro de UV-vis da amostra de Ce6 (Figura 30) é de grande importância para coletar as informações dos FS, pois suas bandas de absorção são características de sua estrutura química. O aumento da saturação das ligações do macrociclo, ou a quebra do mesmo, geram significativas mudanças na absorção das moléculas. Essa mudança é devida à natureza do sistema π de elétrons da estrutura dos átomos do ciclo. (STRANADKO, 2000) A maior parte dos FS sofrem degradação pela luz, e isto gera uma modificação de sua estrutura. Al-Khaza'leh e colaboradores (2011) afirmam que a degradação do anel ou possíveis aglomerados, modificam o espectro de absorção. (AL-KHAZA'LEH, 2011) As clorinas apresentam, na região de 401 nm, uma intensa absorção característica da banda de Soret, presente na família das clorinas. Nas regiões de 505 nm, 606 nm e 660 nm encontram-se as bandas Q, referentes a Ce6. (GLADKOVA, 2010) O processo de degradação também foi mencionado pelo fabricante, que recomendou a utilização de soluções preparadas no momento da utilização, para a reprodutibilidade do espectro da Ce6 em todas as soluções preparadas. Este procedimento foi adotado como padrão para avaliar a qualidade da Ce6. Assim acompanhar as mudanças das regiões de absorção da amostra garantem que as possíveis degradações não irão alterar os efeitos esperados pelo FS na TFD.

A região de 660 nm foi utilizada para correlacionar a absorção obtida pela amostra e a concentração real da solução. Para este procedimento, a amostra inicial de Ce6 com concentração de 5mg/mL passou por onze diluições, e para cada diluição foram coletados os espectros de UV-vis (Figura 36). O gráfico de concentração versus absorção para região de 660 nm foi feito com as diluições que obedeceram a faixa de concentração da Lei de Lambert-

Beer, em que os pontos foram ajustados por uma regressão linear (Figura 31). A equação de ajuste que estabelece a relação entre concentração e absorção foi $y = 0,13 + 12,48X$, em que y representa a absorção na região de 660 nm e x representa o valor da concentração em $\mu\text{g/mL}$. Embora a região de 404 nm apresente a maior banda de absorção para o cálculo de concentração, ela não poderia ser utilizada para as Nps funcionalizadas com Ce6, pois a solução de AuNps também absorve nesta região (Figura 32).

A determinação desta equação foi a ferramenta utilizada para a determinação da concentração das amostras após o processo de funcionalização. Este controle é essencial, pois é necessário relacionar a dose com os resultados de citotoxicidade do novo FS.

5.3. Funcionalização da Clorina e6 a Nanopartículas de ouro.

A química via carbodimida foi escolhida para realizar a funcionalização entre a Ce6 e as AuNps. Nesta reação ocorre a ligação entre um grupo carboxílico e uma amina primária. Os reagentes sulfo-NHS e EDC foram utilizados para aumentar o rendimento da reação e a estabilidade da ligação amida formada. Lahiri e colaboradores demonstraram a facilidade do método via carbodimida para imobilizar moléculas alvo. Eles utilizaram proteínas de diferentes tamanhos em alkenotiolatos, com radical $-\text{COOH}$, ligados a AuNps. (LAHIRI, 1999).

A Ce6 possui três possíveis pontos de ligação, ou seja, três radicais carboxílicos disponíveis (Figura 13). Porém, para aumentar a afinidade à AuNps, uma molécula tiolada com duas aminas primárias foi inserida em sua estrutura química. Assim, foi realizada a ligação entre as moléculas de tiouréia e a Ce6. Inicialmente foi necessário o controle de pH da solução de Ce6, visto que a reatividade do EDC possui faixas indicativas de ativação. Este reagente ativou o grupo carboxílico presente na Ce6 e possibilitou sua ligação a amina primária da tiouréia. Embora a vida útil do ester formado pela reação entre o EDC e a Ce6 seja muito curta, o reagente sulfo-NHS estende o período de utilização. Após a formação da ligação amida, a atividade química é cessada pelo reagente NaOH (Figura 33). A equação global desta reação química é concluída com a ligação entre a Ce6 e a tiouréia e a liberação de uma molécula de água (Figura 34). O processo de purificação eliminou os subprodutos da reação (Figura 22).

O intermediário formado, a Ce6-tiouréia, foi incubado com as AuNps sob agitação por 24 horas, para proporcionar o contato direto entre o enxofre e a superfície da Nps. Após este

período o complexo Ce6-AuNps também passou pelo processo de purificação. A Figura 36, mostra os espectros das AuNps comparadas com os espectros UV-vis de absorção da Ce6 e do novo FS sintetizado. O espectro da amostra Ce6-AuNps mostra que há uma soma dos espectros de Ce6 e AuNps. Na região de 401 nm é possível notar um alargamento de banda para o complexo Ce6-AuNps quando comparado a banda de Ce6. Este efeito deve-se a contribuição da absorção de AuNps nesta região. As duas bandas Q da região de 450- 580 nm somaram-se a banda de ressonância plasmônica das AuNps, formando no complexo somente uma banda larga. Para o novo FS também observa-se o deslocamento da banda na região de 660 nm, que pode ser explicado pela interação da nuvem eletrônica das Nps com o anel pirrólico. Este resultado é bastante promissor em virtude do aumento da transparência da janela ótica para valores acima de 660 nm, chegando a maiores profundidades. Este novo espectro de absorção indica que o processo de funcionalização foi eficiente, visto que as contribuições das bandas de seus constituintes estão presentes na nova amostra formada. Este fato também é observado na coloração da solução, aparentemente preta.

O FT-IR foi escolhido para caracterizar as alterações bioquímicas ocorridas após a reação carbodimida e após o processo de funcionalização. Para isto, duas metodologias foram utilizadas no estudo das amostras. Na primeira etapa as amostras passaram pelo processo de funcionalização seguindo o protocolo descrito na seção 3.4 e o espectro da amostra foi coletado. Para a segunda metodologia, os reagentes utilizados na síntese foram misturados na mesma proporção do protocolo, mas em condições que não favorecem a ativação do grupo carboxílico. (Figura 35). Desta forma, não há condições para a formação da ligação amida. A amostra funcionalizada a AuNps e a mistura dos reagentes também foram analisados. (Figura 43) Os espectros foram adquiridos de 10 μ L de cada amostra

As bandas nas regiões de 3500 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} são referentes ao estiramento de N-H e O-H ambos presentes na estrutura da Ce6 e para o O-H presente na estrutura da molécula de tiouréia. (NAUMAN ,2000; CHENG, 2005) A região de 3100 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} é características da ligação de CH_3 , CH_2 e CH , presentes em toda estrutura do anel pirrólico da Ce6 e seus radicais. (JOSEPH,1987; NAUMAN ,2000) As regiões de 1782 cm^{-1} a 1711 cm^{-1} são referentes a estiramento $\text{C}=\text{O}$ presente em três regiões da estrutura da Ce6. (CHENG, 2005; GLADKOVA, 2010) É importante ressaltar, que a ligação entre carbono e oxigênio estará presente mesmo após a modificação da Ce6 com a tiouréia, pois na formação de uma banda amida existe o grupo funcional de $\text{C}=\text{O}$ em virtude da ligação entre ácido carboxílico e amina primária. Na região de 1658 cm^{-1} a 1598 cm^{-1} é evidenciado a presença de amida II que caracteriza a ligação formada entre o complexo Ce6-tiouréia, esta região é a de maior

importância para a caracterização do complexo formado. (NAUMAN ,2000) A banda da amida II só pode ser observada quando o grupo funcional da Ce6 perde uma molécula de OH e a tiouréia perde uma molécula de H. Portanto na formação da amida II existe a liberação de uma molécula de água. A região de 1571 cm^{-1} pertence a estiramento NH_2 presente na estrutura da tiouréia. Em 1408 cm^{-1} observa-se estiramento de COO^- presente na estrutura da Ce6, pois existem três pontos disponíveis de ligação e também a probabilidade de não haver moléculas de Ce6 em todos eles. Assim, o grupo carboxílico perde uma molécula de H em virtude do processo de diluição, formando o radical COO^- . (JOSEPH,1987) Em 1399 cm^{-1} há deformação simétrica e assimétrica de CH_3 , pertencente aos radicais da Ce6. A região de 1067 cm^{-1} e 1045 cm^{-1} pertence a ligação entre $\text{C}=\text{S}$ presente na molécula de tiouréia. (JOSEPH,1987) Esta confirmação é crucial para o processo de funcionalização com as AuNps, pois o enxofre presente na molécula de tiouréia tem maior afinidade por AuNps. Os modos vibracionais do complexo Ce6-tiouréia e Ce6-AuNps são mostrados na Tabela 4. Dentre as modificações bioquímicas ocorridas a mais importante ocorre na região de 1658 cm^{-1} a 1711 cm^{-1} , pois é evidenciada inversão de bandas entre o grupo funcional amina e o grupo funcional amida, destacado na Figura 41. Este é o principal indício da formação do complexo Ce6-tiouréia. Na Figura 43, são mostradas as diferenças espectrais entre a Ce6-AuNps e a mistura dos reagentes. As bandas referentes a formação da ligação amida e as características do anel da Ce6 sofreram uma intensificação do sinal visto a proximidade da SPRL das AuNps.

Após a confirmação da funcionalização por FT-IR, foi medida a distribuição dos tamanhos da amostra de Ce6-AuNps por DLS (Figura 38). Neste histograma é possível notar três populações de Nps. A primeira, com menor número de Nps, refere-se as AuNps que não foram funcionalizadas, a segunda na região de diâmetro máximo de 220 nm indicam a mudança da camada passivante de citrato pela Ce6, conseqüentemente um aumento do diâmetro médio das Nps quando comparado a AuNps com citrato, e a terceira referente a possíveis aglomerados formados nos procedimentos de purificação das amostras. Apesar da formação de aglomerados, a partir da análise do potencial Zeta, mostrado na Figura 39, mesmo após todas as condições de síntese, em que há mudanças de pH, e a inserção de um novo ligante a superfície da AuNps, não foram capazes de causar qualquer processo de desestabilização das Nps De acordo com os valores apresentados na Tabela 5, o valor de $-44,3\text{ mV}$ indica que a Ce6-AuNps mantém a estabilidade coloidal das AuNps.

5.4. Ensaio de Fluorescência e de Citotoxicidade.

O tempo de captação do FS nas células depende da afinidade bioquímica entre a linhagem celular e o FS. Na literatura, este tempo é mensurado indiretamente por meio da avaliação da viabilidade celular utilizando os ensaios de MTT e Azul de Tripán. (STOCKERT, 2012) Entretanto, os resultados de citotoxicidade da Ce6 mostraram grandes variações, impedindo a determinação precisa do tempo ideal de incubação. Moon e colaboradores testaram diferentes doses de Ce6 em linhagem RK3E-ras em que o tempo de incubação da Ce6 foi de 24 horas. (MOON, 2009) Wang e colaboradores testaram a Ce6 em cultura de células endoteliais da córnea humana por um período de 48 horas de incubação. (WANG, 2013) Feng e colaboradores testaram a viabilidade celular em cultura de células de tumor maligno mamário da linhagem MDA-MB-231, após a incubação da Ce6 por 4 horas. (FENG, 2015) Então, para aferir corretamente o tempo de captação da Ce6, utilizamos a propriedade intrínseca deste FS que é a sua fluorescência. Os ensaios foram realizados em células tumorais malignas mamárias da linhagem MDA-MB-468, com 2, 4 e 8 horas de incubação da Ce6, além do controle (Figura 40). A cor azul vista nas imagens referem-se ao núcleo das células, que emitem fluorescência devido ao corante 4',6' - diamidino-2-fenilindole (DAPI). Este marcador fluorescente tem alta especificidade pelo DNA e pode ser facilmente visto no microscópio de fluorescência. (PERES e CURI, 2005) A cor vermelha refere-se a fluorescência da Ce6. As imagens de fluorescência passaram por um processo de separação das matrizes dos canais RGB (Red, Green, Blue), por meio do programa ImageJ, e os resultados foram mostrados na Tabela 6. A quantificação da intensidade da matriz R, foi atribuída a fluorescência da Ce6 e a matriz B ao núcleo das células. A razão entre a matriz R/B foi utilizada para determinar o melhor tempo de incubação da Ce6 em que aconteceu a maior internalização de FS em um menor tempo. Apesar dos grupos II e III apresentarem uma razão R/B próximas, o grupo II foi escolhido devido a captação de FS em menor tempo. Assim, o tempo de 4 horas foi escolhido para o teste de citotoxicidade, sendo um parâmetro essencial na determinação do tempo de incubação do complexo Ce6-AuNps, uma vez que não foi encontrado registros na literatura.

Após a determinação do tempo de captação pelo FS, diferentes doses de Ce6 foram testadas. O ensaio de MTT foi realizado para as concentrações de 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL de Ce6 e o controle, após 18 horas do término da terapia. Para os grupos não irradiados não houve a mudança de atividade mitocondrial (Figura 41). Para os grupos irradiados, à medida que a dose aumentou, a atividade mitocondrial diminuiu. O grupo

de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade de 88%, o grupo de 1 $\mu\text{g/mL}$ próximo a 50 % e os grupos de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade mitocondrial abaixo de 10 %. Este fato foi evidenciado pela razão da atividade mitocondrial, entre os grupos não irradiados/irradiados, mostrando um aumento significativo após 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 42). O teste por Azul de Tripan (Figura 43) confirma este resultado, visto que a viabilidade celular diminui com o aumento da dose de FS. Assim, a região escolhida para o teste do novo FS, foi de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$ pois nesta região, a Ce6 não causa 100% de morte celular. Então a eficiência no novo FS poderá ser comparada com o padrão Ce6.

Os ensaios de fluorescência para as amostras Ce6-AuNps e Ce6+AuNps não foram realizados, pois a eficiência deste FS foi medida por ensaios por MTT e Azul de Tripan. Os testes de coloração e colorimétrico foram realizados para os ensaios citotóxicos do complexo Ce6-AuNps e para Ce6+AuNps respectivamente. A Figura 44 mostra a atividade mitocondrial para os grupos de Ce6-AuNps em diferentes concentrações. Para os grupos não irradiados, não houve alteração de atividade mitocondrial, exceto para o grupo Ce6+AuNps 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 47). Embora a atividade não fosse 100% como as demais, uma variação de 8% nos resultados de MTT é aceitável pelo estresse oxidativo das células. Os grupos incubados apenas com AuNps não apresentaram mudança na atividade mitocondrial, sendo igual ao resultado do grupo controle. Este fato corrobora com as pesquisas de outros grupos, afirmando que nanoestruturas de ouro com mais de 13 nm não apresentam citotoxicidade, como apresentado na revisão bibliográfica.

Todos os grupos incubados com o complexo Ce6-AuNps apresentaram diferença na atividade mitocondrial após a irradiação, sendo este valor menor que 10%. Os resultados de MTT foram complementares aos de Azul de tripan (Figura 45), pois todas amostras irradiadas com o complexo Ce6-AuNps apresentaram 0% de viabilidade celular. Os resultados apontam um aumento da eficiência da Ce6 na presença de AuNps, mas não foi observado nenhuma vantagem do processo de funcionalização. Este fato deve-se a proximidade das AuNps à Ce6 quando submetidos ao teste em cultura de células, porém esta condição é dependente de muitas variáveis, como captação pela célula, condições do meio, aglomeração das Nps. Embora os resultados mostrem que o processo de funcionalização não seja necessário, ligar as AuNps a Ce6 garantem que no momento da irradiação as AuNps estarão próximas da Ce6. Sugere-se que o aumento da eficiência do FS pode ser justificado tanto pela presença de moléculas de oxigênio na superfície da AuNps, provenientes da molécula de citrato, ou pela disponibilidade de elétrons livres da banda de condução das AuNps que podem participar das reações fotoquímicas.

6. CONCLUSÃO

A síntese de AuNps, conforme a reação de Turkevitch foi realizada satisfatoriamente. (Turkevitch, 1956) A solução preparada obteve estabilidade química e boa distribuição de tamanho, com um tamanho médio de aproximadamente 22 nm. A proporção entre os reagentes utilizados de 1:16 produz Nps uniformes e o procedimento é reprodutível. A análise de MET e DLS mostraram que as Nps apresentam morfologia esférica e com boa distribuição. A solução coloidal apresenta banda de ressonância característica, na região de 525 nm, como mostrado pela análise por UV-vis, e potencial Zeta referentes às soluções com estabilidade química.

A Ce6, FS de segunda geração, foi modificada quimicamente por uma molécula de tiouréia, para aumentar sua afinidade à AuNps. Esta modificação química foi realizada pela rota carbodimida e sua eficácia foi medida por meio da técnica de FT-IR. Dentre as modificações bioquímicas ocorrida, as mais importantes ocorreram na região de 1658 cm^{-1} a 1711 cm^{-1} , região em que há a inversão de bandas entre a amina e a amida, caracterizando a ligação da Ce6-tiouréia.

A confirmação da formação do novo complexo AuNps-Ce6 foi realizada pela espectroscopia no UV-vis, que mostrou que o espectro da amostra possui contribuição dos dois constituintes em seu espectro. Nota-se um alargamento de banda na região de 400 nm, as bandas Q da Ce6 unem-se a banda de ressonância plasmônica da AuNps e na região de 660 nm há um deslocamento da banda Q para o novo FS.

A eficiência da AuNps-Ce6 foi avaliada por ensaios de MTT e Azul de Tripan que mostraram que o novo FS nanoestruturado possui alta eficiência em baixas concentrações quando comparado à Ce6, e não possui citotoxicidade quando não irradiado. Neste mesmo teste foram testadas as amostras de Ce6+AuNps, em que não há funcionalização, e os resultados mostram que não há significativas diferenças entre a AuNps-Ce6 e a AuNps+Ce6. Porém, o processo de funcionalização torna-se indispensável visto que fornece a garantia de que ao ser irradiado, a AuNps estará próxima a Ce6, e assim potencializar o seu efeito. Assim, conclui-se que este novo FS nanoestruturado pode ser utilizado em TFD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. **Textbook of epidemiology**. 2nd ed.: Oxford University Press, 2008.
- AILI, D. et al. Self-assembling fibers and nano-rings from disulphide linked helix-loop-helix polypeptides. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 47, p. 5554-5556, 2008.
- AL-KHAZA'LEH, K., et al. Photobleaching of Sn (IV) chlorine e6 dichloride
- ALKILANY, A. M. et al. Toxicity And Cellular Uptake Of Gold Nanoparticles: What We Have Learned So Far? **Journal of Nanoparticle Research**. v. 12 p. 2313–2333, 2010.
- AMENDOLA V.; MENEGHETTI, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by Uv-Vis Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p.4277–4285, 2009.
- ANDRADE, J. E. **Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH**. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências (Física), 2008.
- ARYAL, S. et al. Spectroscopic identification of S Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A**. p. 160–163, v.63, 2006.
- BALASUBRAMANIAN, A., et al. Characterization, Purification, and Stability of Gold Nanoparticles. **Biomaterials**. v. 31, 2010.
- BATTOCCHIO, C. Gold Nanoparticles Stabilized With Aromatic Thiols: Interaction at the Molecule–Metal Interface and Ligand Arrangement in the Molecular Shell Investigated By Sr-Xps and Nexafs. **The Journal of Physical Chemistry C**. v. 118, p. 8159–8168. 2014,
- BEDÊ P. M.; **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas**. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências dos Materiais, 2010.

BIJU, VASUDEVANPILLAI. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 3, p. 744-64, 2014.

BONNET, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society**, v. 24, p. 19-33, 1995.

BONNETT, R., **Chemical aspects of photodynamic therapy**. Gordon and breach science publishers, Amsterdam, v.32, p.1356, 2000.

BRUST, M.; KIELY, C. J. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and surfaces A-physicochemical and engineering aspects**. v. 202, p.175-186, 2002.

BYDOUN, M.; MARCATO, P.; DELLAIRE, G. Breast Cancer Ge- nomics, In Cancer Genomics. **Academic Press, Boston**, Pages 213-232, 2014.

CAI, W., et al. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnology, Science and Applications**. p. 17-22, v.1, 2008.

CALVETE, M.; GOMES, A.; MOURA, N. Clorinas em terapia fotodinâmica - sínteses e aplicações. **Revista virtual de química**, v. 1, n.2, p. 92-103, 2009.

CAPEK, I. et al. Dispersions Based on Noble Metal Nanoparticles-Dna Conjugates. **Advances In Colloid And Interface Science**. v. 163, p. 123–143, 2011.

CESTARI, T.F.; PESSATO, S.; CORRÊA, G. P. Fototerapia: Aplicações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 82, 2007.

CHECHIK, V., CROOKS, R.M. Monolayers of thiol-terminated dendrimers on the surface of planar and colloidal gold. **Langmuir**.v. 15, p. 6364-6369, 1999.

CHENG G., ZHAO J., Y. TU, P. HE, Y. FANG, A sensitive DNA electrochemical biosensor based on magnetite with a glassy carbon electrode modified by multi-walled carbon nanotubes in polypyrrole, **Analatical Chimica Acta**, v.533, p. 11-16 ,2005.

CHO H.; JUNG J; CHUNG B.H. Scanometric analysis of dna microarrays using dna intercalator-conjugated gold nanoparticles. **Chemical Communications**. v.48, p. 7601, 2012.

COLUSSI, V.C. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da depressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos**. 1997. 100f.

tese(doutorado) – faculdade de ciências médicas, universidade estadual de campinas,campinas, 1997.

CONNOR, E. E. et al, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. **Small**, v.1, p. 325–327, 2005.

CORBIERRE, M.K. et al. Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles and Their Incorporation into Polymer Matrices. **Journal of the American Chemical Society**, 2001.

DENOVIX, 2014. Disponível em: <[HTTP://WWW.DENOVIX.COM/WP-CONTENT/UPLOADS/2014/06/DS-11-USER-GUIDE-5.29.14.PDF](http://www.denovix.com/wp-content/uploads/2014/06/DS-11-user-guide-5.29.14.pdf)> Acessado em Agosto de 2014.

DING, Y. et al. Adsorption characteristics of thionine on gold nanoparticles. **Langmuir**. v.5, p. 2292-8, 2006.

DOUGHERTY, T.J.; et al.. Review: photodynamic therapy. **Journal of the national cancer institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DU Y.K., et al. Alkanethiol-stabilized decahedron of gold. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, p. 535–537, 2005.

DYKMAN, L. A., KHLEBTSOV, N. G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. **Acta Naturae**. v. 3, n. 2, p.9, 2011.

EL-SAYED, M.A, Link, S. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. **International Reviews in Physical Chemistry** v. 3, p. 409-453, 2000.

FENG, X.;et al. Glycolytic inhibitors 2-deoxyglucose and 3-bromopyruvate synergize with photodynamic therapy respectively to inhibit cell migration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. 2015.

FICHEUS, H. Photodynamic therapy: principles and therapeutic indications. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. V. 67, p. 32-40, 2009.

FINKELSTEIN, A. E. et al. Auranofin: new oral gold compound for treatment of rheumatoid-arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v.35, p. 251–257, 1976.

FOOTE, C.S. DEFINITION OF TYPE I AND II PHOTSENSITIZED OXIDATION. **PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY**, V. 54, P. 659, 1991.

FOOTE, C.S. DEFINITION OF TYPE I AND II PHOTSENSITIZED OXIDATION. **PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY**, V. 54, P. 659, 1991.

FRENS G. CONTROLLED NUCLEATION FOR THE REGULATION OF THE PARTICLE SIZE IN MONODISPERSE GOLD SUSPENSIONS. **NATURE**. p.241:20-2, 1973.

FRONTIER, SCIENTIFIC, 2014. Disponível em <[HTTP://ORDERS.FRONTIERSCI.COM/ORDERS/WEBPLUGIN/PRODDetail.aspx?CAT=CE6](http://orders.frontiersci.com/orders/webplugin/proddetail.aspx?CAT=CE6)> Acessado em Agosto de 2014.

GERWECK, L.E.; SEETHARAMAN, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer, **Cancer Research**. v. 56, p. 1194–1198, 1996.

GHOSH, P., et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 11, p.1307-15, 2008.

GLADKOVA, O. L. et al. FTIR spectra and normal-mode analysis of chlorin e(6) and its degradation-induced impurities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 3, p. 388-94, 2010.

GLOBOCAN, 2012. WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. GLOBOCAN 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 13 de agosto de 2014.

GOODMAN, C. M., Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjugate Chemistry**. v. 15, p 897–900, 2004.

GOREN, M. et al. Adsorption of alkylthiol-capped gold nanoparticles onto alkylthiol self-assembled monolayers an SPR study. **Langmuir**, v. 22, p. 1048-1054, 2006.

GORMAN, S. A.; BROWN, S. B.; GRIFFITHS, J. Overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of environmental pathology. Toxicology and oncology*, v., p. 25, p. 71-108, 2006.

GORUP, L. F. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos. Dissertação de mestrado. São Carlos. SP. 2010.

HAMBLIN, M. R.; et al. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochemistry and photobiology*, v. 75, p. 51-57, 2002.

HAMBLIN, M.R., HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infections disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*. V.3, p. 436 – 450, 2004.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. *Current drug targets*, v.6, p.615-627, 2006.

HARUTA M. Size- and support-dependency in the catalysis of gold. *Catalysis Today*. v. 36, 1997.

HE, P.; URBAN, M.W. Phospholipid-stabilized Au-nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1224, 2005.

HENDERSON, B.; W.; DOUGHERTY, T. J.; How does photodynamic therapy works? *Photochemistry and Photobiology*, v. 55, n.1, p. 145-157, 1992.

HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**, THIRD ED., MARCEL DEKKER, NEW YORK, 1997.

HIRAMATSU, H., OSTERLOH, F.E. A simple large-scale synthesis of nearly monodisperse gold and silver nanoparticles with adjustable sizes and with exchangeable surfactants. *Chemistry of Materials*, v. 16, p. 2509–11, 2004.

HOOLEY, J.L. et al. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease, *Radiotherapy and Oncology*. v. 2, 343–366, 1984.

HORVATH H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles:

HOSSEIN, E. P. et al. Protoporphyrin Ix—Gold Nanoparticleconjugates As An Efficient Photosensitizer Incervical Cancer Therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 10, p 304—312, 2013.

HUANG, Y. Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. **Biomedical Optics & Medical Imaging**. SPIE, 9 July 2009.

HURST, S. J. et al. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. **Analytical Chemistry**. v. 78, p. 8313-8318, 2006.

INCA, 2007.**Resumo. Alimentos, Nutrição, Atividade Física e Prevenção do Câncer. Uma perspectiva global**. Tradução de Athayde Handson Tradutores. Rio de Janeiro, 12 p.,2007.

INCA, 2014. Disponível em:

<[HTTP://WWW2.INCA.GOV.BR/WPS/WCM/CONNECT/TIPOSDECANCER/SITE/HOME/MAMA](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama)>. Acesso em:13 de agosto de 2014.

IVANOV, A.V.; RESHETNICKOV, A.V.; PONOMAREV, G.V. One more pdt application of chlorin e6. **Proceedings of spie**, v. 3909, p. 131-137, 2000.

IVANOV, A.V.; RESHETNICKOV, A.V.; PONOMAREV, G.V. One more pdt application of chlorin e6. **Proceedings of spie**, v. 3909, p. 131-137, 2000.

JAIN, P. K., EL-SAYED, I. H., EL-SAYED, M. A. Au nanoparticles target cancer. **Nanotechnology today**. v.2, p.18-29, 2007.

JAIN, P. K.; LEE, K. H. EL-SAYED S. I.; EL-SAYED, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. **The Journal of Chemical Physics**. B v.110, p. 7238–7248, 2006.

JANS, S. H.; et al. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies Hilde. **Analytical Chemistry**. v. 81, p. 9425–9432, 2009.

JI, X., et al. Size Control Of Gold Nanocrystals In Citrate Reduction: The Third Role Of Citrate. **Journal of American Chemical Society**. v. 129, p. 13939– 13948, 2007.

- JIMENEZ, V. L. et al. Hexanethiolate monolayer protected 38 gold atom cluster. **Langmuir**, v. 20, p. 6864–6870, 2004.
- JOSEFSEN, L.B., BOYLE, R.W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizer's onde step closer? **Bristsh Journal of Phamacology**, v. 154, p.1-3, 2008.
- JOSEPH. B. L. **Introduction to organic Spectroscopy**, Macmillan Publication. New York, 1987.
- JOYDEEP L.; et al. A Strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study. **Analytical Chemistry**. v. 71, p. 777-790, 1999.
- KATZ E, WILLNER I. Integrated Nanoparticle-Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications. **Angewandte Chemie International Edition** v. 43, 2004.
- KAUSHIK, V.; et al . Exploring geometric properties of gold nanoparticles using tem images to explain their chaperone like activity for citrate synthase. **Bioinformation**, v. 7, p.320-323, 2011.
- KELLY, K.L., et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B** v. 29, p. 107, 2003.
- KHLEBTSOV B. N.; KHLEBTSOV, N. G. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. **Colloid Journal**, vol. 73, p. 118–127, 2011.
- KOCHEVAR, I. E.; et. Al. Comparision of photosensitized plasma membrane damage caued by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica ET Biophysica acta**, v. 1280, p.223-230, 1996.
- KRALCHEVSKY, et al. **Handbook of Surface and Colloid Chemistry**, 2009.
- KRENA, J. R., et al. **PHYSICAL REVIEW LETTERS**.v. 82, p.2590, 1999.
- KUBLER, A.; et al. Analysis of cost effectiveness of photodynamic therapy with Foscan (Foscan- PDT) in comparison with palliative chemotherapy in patients with advanced head-neck tumors in Germany. **Laryngorhinootologie**, v. 10, p725-732, 2005.

KUMAR, C.S.S.R. Biofunctionalization of nanomaterials. **Weinheim: Wiley-Vch**, v.1, 2005.

KUMAR, S. GANDHI, K.S., KUMAR, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method. **Industrial Engineering Chemistry Research**. v. 46, p. 3128-36, 2007.

LAHIRI J., et al. A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study. *Analytical Chemistry*, v.71, p. 777–790, 1999.

LAURENT, G. et al. Imaging surface plasmon of gold nanoparticle arrays by far-field Raman scattering. **Nano Letters**. v. 5, p. 253–258, 2005.

LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**. 1st Edition Elsevier Science 2008.

LEANNE J. L. **Development of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências). Dalhousie University. Halifax, Nova Scotia, July 2013.

LEE, K. S. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 14, p. 7238–7248, 2006.

LEVY, R. et al. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles *Journal of the American Chemical Society*. v.126, p. 10076–10084, 2004.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; GRAY, M.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of câncer. **Cancer**, v. 20, n. 12, p. 2255-2258, 1967.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; GRAY, M.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of câncer. **Cancer**, v. 20, n. 12, p. 2255-2258, 1967.

LKHAGVADULAM, B.; et al. Size-dependent photodynamic activity of gold nanoparticles conjugate of water-soluble purpurin-18-n-methyl-d-glucamine. **Biomed Research International**. ID 720579, 2013.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MANDAL, T.K.; FLEMING, M.S.; WALT, D.R. Preparation of Polymer Coated Gold Nanoparticles by Surface-Confined Living Radical Polymerization at Ambient Temperature. **Nano Letter's** .v. 2, p. 3–7, 2002.

MILLSTONE, J. E, et al. Observation of a Quadrupole Plasmon Mode for a Colloidal Solution of Gold Nanoprisms. **Journal of the American Chemical society**, 5312, I27, 2005.

MILLSTONE, J.E., et al. DNA–gold triangular nanoprism conjugates. **Small**, v.4, p. 2176–2180, 2008b.

MIRABELLA, F. M. In Internal Reflection Spectroscopy Theory and Applications. Mirabella, F. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1993.

MOJZISOVA, H. et al. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2748–2756, 2007.

MONAGLE, J. J. Carbodiimides. iii. Conversion of isocyanates to carbodiimides. Catalyst studies. **Journal of Organic Chemistry**.v.27, p. 3851–3855, 1962.

MOON, Y. Efficient preparation of highly pure chlorin e6 and its photodynamic anti-cancer activity in a rat tumor model, **Oncology Reports**.v. 22, p. 1085-1091, 2009

MOORE, W.J.; **FÍSICO-QUÍMICA**; 4ª ED.; vol. 2; São Paulo: Edgard Blücher, p. 705 – 706, 1976.

NAKA, K.; TANAKA, H.; CHUJO, Y. pH Responsive Aggregation of Imidazolium Cations-Modified Gold Nanoparticles with Poly(acrylic acid) in Aqueous Solution. **Polymer Journal**. v. 39, p. 1122–1127, 2007.

NAKAJIMA, N; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry**. v.6, p.123. 1995

NAUMANN, D.; **INFRARED SPECTROSCOPY IN MICROBIOLOGY**, 2000.

NAVARRO, J. R. G.; WERTS, M. H. V. Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold–silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. **Analytst**. V. 138, p. 583, 2013.

NERI, C.R.; et al. Determination of the photodynamic activity of porphyrins: potential photosensitizers for treatment of age-related macular degeneration. **Materials science**, v. 20, n. 2, p. 69-75, 2002.

NGUYEN, D.T., et al. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. **Micron**. v. 42, p. 207-227, 2011.

NGUYEN, D.T., et al. Experimental measurement of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of HAuCl₄. **Advanced Powder Technology**. v. 21, p. 11–118, 2010.

NICHOLSON, R.I.; GEE, J.M.W.; HARPER M.E. EGFR and cancer prognosis. **European Journal of Cancer**. v. 37, p. 9-15, 2001.

NIXON, W. C. **The general principles of scanning electron microscopy; philosophical transactions of the royal society of london. Series b, biological sciences**, v. 261, NO. 837, A Discussion On New Developments In Electron Microscopy With Special Emphasis On Their Application In Biology. p. 45-50, 1971.

OJEA, J. ET AL. Instability Of Cationic Gold Nanoparticle Bioconjugates: The Role Of Citrate Ions. **Journal of American Chemical Society**, v.131, 2009.

OWEN, T. **Fundamentals of UV-visible Spectroscopy**. Agilent Technologies, Germany 2000.

PAN, Y., et al. Size-Dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v.3, p.1941–1949, 2007.

PASS, H.I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **Journal of the national cancer institute**, v. 85, n. 6, p. 443-456, 1993.

PATRA, H.K., et al. Cell selective response to gold nanoparticles. **Nanomedicine**. v. 3, p.111–119, 2007.

PERES, C. M.; CURI, R. **COMO CULTIVAR CÉLULAS**. EDITORA GUANABRAA KOOGAN, 2005.

PERKIN ELMER, 2007. Disponível em:

<http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf>. Acesso em: 13 de agosto de 2014.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 67, p. 59-98, 2008.

PORTA, F. et al. Gold-ligand interaction studies of water-soluble aminoalcohol capped gold nanoparticles by NMR. **Langmuir**, v. 24, p. 7061–7064, 2008.

RAAB O. UEBER DIE WIRKUNG FLUORIZIERENDER STOFFE AUF INFUSORIEN. **Z. BIOL.** v. 39, p. 524-546, 1900.

Radiative Transfer. v. 110, p. 787-799, 2009.

REIMER, L.; **Transmission Electron Microscopy**, W.T. RHODES (ED.), SPRINGER, BERLIN, 1989.

RESHETNICKOV, A.V.; et al. Novel drug form of chlorine6. In: optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy, 9. **Proceedings of spie**, v. 3909, p. 124-130, 2000.

RIABININA, D.; et al. Control of Gold Nanoparticles Synthesized By Laser Ablation In Liquid Media **Nanotechnology**. v.2012, p. 297863, 2012.

ROCO, M. C. BAINBRIDGE, W. S. Converging technologies for improving human performance: integrating from the nanoscale. **Journal of nanoparticle research**, v. 4, n. 4, p. 281-295, 2002.

ROSENTHAL, I.; BEN-HUR, E. Role of oxygen in the phototoxicity of phtalocyanines International. **International Journal of Radiation Biology**. v. 67, p. 85-91, 1995.

ROTOMSKIS, R., STRECKYTE, G., BAGDONAS, S. () Phototransformations of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 39, p. 172–175, 1997.

SAGHATCHIAN, M.; et al. Exploring frontiers: use of complementary and alternative medicine among patients with early-stage breast cancer. **The Breast**. v.23, p. 279-285, 2014.

SANTOSH, A. A., et al. Spectroscopic Identification Of S Au Interaction In Cysteine Capped Gold Nanoparticles **Spectrochimica Acta Part A**. v. 63, p. 160–163, 2006.

SHAN, J. M. et al. Preparation of Poly (N-isopropylacrylamide)-Monolayer-Protected Gold Clusters: Synthesis Methods, Core Size, and Thickness of Monolayer. **Macromolecules**. v.36, p. 4526–4533, 2003.

SHEM, P. M. One-step synthesis of phosphine-stabilized gold nanoparticles using the mild reducing agent 9-BBN. **Langmuir**, v. 23, p. 13279-83, 2009.

SHIA, W. et al. Gold Nanoparticles Surface-Terminated With Bifunctional Ligands. **Colloids and surfaces a: physicochem. Eng. Aspects**. v. 246, p. 109–113, 2004.

SHUKLA, R. et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a Microscopic overview. **LANGMUIR**. v.21, p. 10644–10654, 2005.

SIGMA, ALDRICH, 2014. Disponível em:

<[HTTP://WWW.SIGMAALDRICH.COM/CATALOG/PRODUCT/SIAL/T8656?LANG=PT ®ION=BR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/t8656?lang=pt®ion=br)> Acessado em Agosto de 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** 7 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 490 p, 2006.

SONNICHSEN, C., REINHARD, B. M., LIPHARDT, J., ALIVISATOS, A. P.. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 741-745, 2005.

SPRING, K. R. Fluorescence Microscopy. **Encyclopedia of Optical Engineering**, 2003.

STERNBERG, E.D., DOLPHIN, D., BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron Reports*. v. 54, p. 4151- 4202, 1998.

STOCKERT, J. C. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**. v. 114, p. 785-796, 2012.

STORHOFF J. J., et al. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. **Journal of the American Chemical Society**. v. 120, p. 1959, 1998.

STRANADKO, E.PH; et al. The first experience of photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. in:optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy. **Proceedings of spie**, v. 3909, p. 138-144, 2000.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. INGLATERRA: JOHN WILEY & SONS, P. 224. 2004.

TAYLOR, **Handbook of Surface and Colloid Chemistry**. Surface and colloid chemistry. 2009.

TERANISHI, T. et al. Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles Using Linear Polymers as Protective Agents. *Advanced Materials*, v. 8, p. 596-599, 1999.

TERANISHI, T.; KIYOKAWA, I.; MIYAKE, M. ADV. MATER. Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles Using Linear Polymers as Protective Agents. **Advanced Materials**, v. 10, p. 596–599, 1998.

THAKOR, A.S. et al. Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients. **Nano Letters**. v.11, p. 4029-36, 2011.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**. v.11, p. 55–75, 1951.

VAN LIER, J; SPIKES, J. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phtalocyanines. **CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM**, V.149, p.17-26, 1989.

VILLIERS, C.L. et al. Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: effect on dendritic cell functions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 55–60, 2009.

WANG J. et al. Impact of photodynamic inactivation (PDI) using the photosensitizer chlorin e6 on viability, apoptosis, and proliferation of human corneal endothelial cells **Clinical and Experimental Ophthalmology**. v. 251, p.1199–1204, 2013.

WANG, H. et al. Ultrasound enhances the efficacy of chlorin E6-mediated photodynamic therapy in MDA-MB-231 cells. *Ultrasound medical Biology*. v. 9, p. 1713-24, 2013.

WARTEWIG, S. **IR and Raman Spectroscopy Fundamental Processing**. WILEY, 2003.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission electron microscopy. A textbook for Materials science**, Plenum Press, NEW YORK, 1996.

WU, R. H. A facile route to tailoring peptide-stabilized gold nanoparticles using glutathione as a synthon. **Molecules**. v. 19, p. 6754-6775, 2014.

XU, R. Progress in Nanoparticles Characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, p. 112-115, 2008.

YAH, C. S. The Toxicity of Gold Nanoparticles In Relation To Their Physiochemical Properties. **BIOMEDICAL RESEARCH**, v. 24, p. 400-413, 2013.

YOO, C.I., et al. A facile one-pot synthesis of hydroxyl-functionalized gold polyhedrons by a surface regulating copolymer. **Chemical Materials**, v. 21, p. 939–944, 2009.

ZENG, S. A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. **Plasmonics** . v. 6, p. 491–506, 2011.

ZHANG, X. et al. Progress of photodynamic therapy applications in the treatment of musculoskeletal sarcoma (Review). **Oncology Letters**. p. 1403-1408, 2014.

ZHOU J. et al. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. **Journal of colloid and interface science**. v. 331, p. 251–262, 2009.

ZHOU, D. et al. Effects of novel quasi-interpenetrating network/gold nanoparticles composite matrices on DNA sequencing performances by CE. **Electrophoresis**. v. 28, p 2998-3007, 2007. **Journal of the American Chemical Society**. v. 129, 13939-13948, 2007.