

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**Caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas
de ouro cobertas com citrato**

Antonio Djalma Santos

Brasília

2015

Antonio Djalma Santos

**Caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas
de ouro cobertas com citrato**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Dra. Mônica Pereira Garcia

Santos, Antonio Djalma

Caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ouro cobertas com citrato / Antonio Djalma Santos - 2015

53 f. Dissertação de Mestrado

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2015

1. Nanopartículas de ouro

2. citotoxicidade

3. nanobiotecnologia

I. Garcia, Mônica Pereira

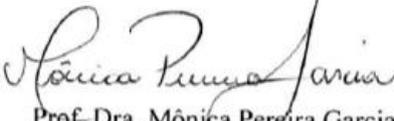
Dissertação de Mestrado

Antonio Djalma Santos

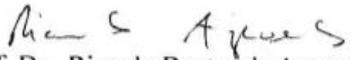
Título:

“Caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ouro cobertas com citrato”

Comissão Examinadora:


Prof. Dra. Mônica Pereira Garcia
Presidente
UnB


Prof. Dra. Carolina Madeira Lucci
Membro Titular Interno não vinculado ao
Programa
UnB


Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
Membro Titular Interno vinculado ao programa
UnB

Brasília, 27 de agosto de 2015.

Dedico este trabalho a minha amada família, em especial a minha esposa Caroline e aos meus filhos Murilo, Laura e Letícia e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, que iluminam meus passos nessa caminhada.

Aos meus pais, que sempre proporcionaram a mim e a meus irmãos uma educação focada em princípios morais e dignos.

Aos meus sogros pelo auxílio nos momentos de dificuldade.

Aos meus irmãos pela amizade em todos os momentos.

A minha esposa, por todo amor e companheirismo durante todos esses anos.

Aos meus filhos Murilo, Laura, Letícia razão de alegria em minha vida.

A professora Mônica, por todos os ensinamentos e encorajamento.

A todos os amigos do laboratório de Nanotecnologia e a Karen, por todo o suporte, reflexões e ensinamentos, sua orientação foi parte fundamental dessa dissertação.

Ao Professor Ricardo Bentes, por manter seu laboratório sempre de portas abertas.

Ao CNPq, à FAP/DF, à CAPES e ao INCT de Nanobiotecnologia, pelo fomento dos estudos em nanotecnologia.

A Universidade de Brasília, pelo suporte físico e pelos momentos alegres e também aflitos que já vivi em todos estes anos.

A todos que direta ou indiretamente, ajudaram no desenvolvimento desse estudo e contribuíram no meu crescimento profissional e pessoal.

O trem da vida

A vida é como uma viagem num trem, com suas estações, suas mudanças de curso, seus acidentes.

Ao nascermos, pegamos o trem e nos encontramos com nossos pais, e acreditamos que sempre viajarão ao nosso lado, mas, em alguma estação, eles descem e nos deixam sós na viagem.

Da mesma forma, outras pessoas pegarão o trem e nos serão significativas: nossos irmãos, amigos, filhos e até mesmo o amor da nossa vida.

Muitos descerão e deixarão um vazio permanente, outros passam tão despercebidos que nem nos damos conta que eles desocuparam seus assentos.

Esta viagem estará cheia de alegrias, tristezas, fantasias, esperas e despedidas. O êxito consiste em ter uma boa relação com todos os passageiros, dando o melhor de nós.

O grande mistério para todos é que não sabemos em qual estação desceremos. Por isso, devemos viver da melhor maneira, amar, perdoar, oferecer o melhor de nós.

Assim, quando chegar o momento de desembarcar e o nosso assento estiver vazio, vamos deixar bonitas lembranças aos que continuam viajando no trem da vida!!!!

Desejo a você que a viagem em seu trem seja melhor a cada dia, com muito sucesso e amor. Ah! E lhe agradeço por ser passageiro do meu trem.

Papa Francisco

RESUMO

Apesar de seu conhecimento há milênios, a utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) na medicina, principalmente em estudos de diagnósticos e terapias, tais como: agente de entrega de droga e de contraste em imagenamento, terapia gênica, entre outros, têm se desenvolvido nos últimos anos. Os nanomateriais podem ser altamente reativos e desestabilizar a homeostase dos sistemas biológicos, devido a seu tamanho, forma, carga, composição e cobertura estabilizante. Assim, considerando a utilização de AuNPs na nanomedicina, este trabalho estudou AuNPs recobertas com citrato, quanto as suas características físico-químicas, estabilidade e toxicidade. Os resultados mostram que sua síntese foi eficiente na produção de nanopartículas polidispersas e esférica, com diâmetro médio de 35 nm, carga superficial negativa e diâmetro hidrodinâmico (DH) de 50 nm, único parâmetro que variou em função da temperatura de armazenamento, mantendo-se constante quando mantidas a 37 °C, porém houve uma aumento do DH quando estocadas a temperatura ambiente ou 4 °C, indicando agregação das mesmas. Exame macroscópico comprovou a precipitação das mesmas. É possível que esta agregação ocorra principalmente em função da diminuição do movimento browniano das partículas, que leva ao aumento da interação e reação interpartículas e sua conseqüente perda de estabilidade. Os testes citotoxicidade em fibroblastos murinos (NIH-3T3) demonstraram que a incubação com AuNPs por até cinco dias não alterou o índice celular, independentemente da concentração utilizada. Por outro lado, após este período, para concentração de ouro de 35 µg/mL, houve queda no índice

celular, indicando a morte das células e/ou efeito citostático por parte das AuNPs. Os resultados indicam que as AuNPs recobertas com citrato são estáveis, porém apresentam citotoxicidade tempo e dose dependente.

ABSTRACT

Use of gold nanoparticles (AuNPs) in medicine particularly in diagnostic studies and therapies, such as drug delivery and imaging contrast agents, gene therapy, among others, have been developed in the last years. Nanomaterials can be highly reactive and destabilize homeostasis of biological systems due to its size, shape, charge, composition and stabilizing cover. Thus, considering use of AuNPs in nanomedicine, this paper studied AuNPs coated with citrate, as its physical and chemical characteristics, stability and toxicity. Results show that synthesis was efficient in producing polydisperse and spherical nanoparticles with average diameter of 35 nm, a negative surface charge and hydrodynamic diameter (DH) of 50 nm. Except for DH, no other parameters varied depending on storage temperature. In fact DH was constant when kept constantly at 37 °C, but there was an increase in DH when stored at room temperature or 4 °C, indicating their aggregation. Macroscopic examination proved the precipitation thereof. It is possible that this aggregation occurs mainly due to decrease in the Brownian motion of particles, which leads to increased interparticle interaction and reaction, and consequent loss of stability. Testing cytotoxicity in murine fibroblasts (NIH-3T3) demonstrated that incubation with AuNPs for up to five days did not affect cell content, regardless of concentration used. Moreover, after this period, for gold concentration of 35 µg/mL, there was a drop in Cell Index, suggesting cell death and/or cytostatic effect by the AuNPs. Results indicate that AuNPs coated with sodium citrate are stable but have time and dose-dependent cytotoxicity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de equipamentos	9
Tabela 2 - Reagentes.....	10
Tabela 3 - Materiais de uso geral	10

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando nanopartículas de ouro recobertas com citrato. Barras correspondem a 100 nm (A) e 50 nm (B).....19
- Figura 02.** Espectros de absorvância de diferentes concentrações (0,07 a 35 µg/mL) de nanopartículas de ouro recobertas com citrato.....20
- Figura 03.** Valores do diâmetro hidrodinâmico (DH) das nanopartículas de ouro recobertas com citrato ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas de armazenamento. Valores determinados por meio do espalhamento dinâmico de luz.21
- Figura 04.** Valores do índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas de ouro recobertas com citrato ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas de armazenamento. Valores determinados por meio do espalhamento dinâmico de luz.....22
- Figura 05.** Valores do potencial zeta (Ptz) das nanopartículas de ouro recobertas com citrato, ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas de armazenamento. Valores determinados por meio do espalhamento dinâmico de luz.....22
- Figura 06.** Amostras de nanopartículas de ouro recobertas com citrato após 90 dias de armazenamento a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (Amb), 37 °C e 4 °C. As setas ressaltam a presença de precipitado no fundo dos tubos.....23
- Figura 07.** Viabilidade de células da linhagem NIH-3T3 após 24 e 48 horas na presença de nanopartículas de ouro recobertas com citrato, determinada por meio do ensaio de metabolização de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio)..... 24
- Figura 08.** Índices celulares de fibroblatos murinos (NIH-3T3) em relação ao tempo de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas de ouro recobertas com citrato (AuNPs). Valores determinados por meio do ensaio RTCA. Controle foram células incubadas apenas com meio de cultivo. Np significa poço contendo apenas AuNPs nas concentrações indicadas em meio de cultivo (sem a presença de células). A barra transversal azul indica o fim do período de 24 h que precediam a incubação com as nanopartículas. A seta preta indica o início da exposição das células às AuNPs. * sem diferença significativa (p<0,05) e ** com diferença significativa (p<0,05).....26

ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

ATCC®: American Type Cell Culture

AuNP: nanopartícula de ouro recoberta com citrato

DH : diâmetro hidrodinâmico

DLS :dispersão dinâmica de luz

DNA : ácido desoxirribonucleico

DMEM: modificação do meio Eagle Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERRO: espécie reativa de oxigênio

IPD: índice de polidispersão

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MTT: brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

PBS:tampão fosfato salina

PRB: banda de ressonância de plasmon

Ptz::potencial zeta

RTCA: real-time cell analysis

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Nanotecnologia.....	1
1.2. Nanopartículas metálicas	2
1.3. Nanopartículas de ouro	3
1.4. Nanomateriais e nanotoxicologia	5
2. Justificativa.....	7
3. Objetivos	8
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos	8
4. Material e Métodos	9
4.1 Equipamentos, Reagentes e Materiais de Uso Geral	9
4.2. Preparação das nanopartículas de ouro recobertas com citrato.....	11
4.3. Caracterização e avaliação da estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro recobertas com citrato	12
4.4. Linhagem celular	13
<i>4.4.1 Manutenção e propagação das células.....</i>	<i>13</i>
4.5. Determinação da citotoxicidade das nanopartículas de ouro recobertas com citrato sobre células da linhagem NIH-3T3.....	15
4.6. Dinâmica da proliferação de células da linhagem NIH-3T3 na presença de nanopartículas de ouro cobertas com citrato	16
4.7 - Análises estatísticas	17
5. Resultados	19
6. Discussão	27

7. Conclusão	35
8. Referências Bibliográficas	36

1. Introdução

1.1. Nanotecnologia

Apesar da famosa e importante palestra de Richard Feynman em 1952, em que ele aventou a possibilidade da manipulação de átomos e moléculas para formar estruturas nanométricas, a palavra nanotecnologia surgiu apenas em 1974, quando o pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, utilizou este termo para descrever as tecnologias que permitem a construção de materiais em escala nanométrica.

Um dos problemas que enfrentam a nanotecnologia é a confusão sobre a sua definição. A edição inaugural da revista Nature Nanotechnology, uma das mais importantes revistas científicas da atualidade na área, perguntou a treze pesquisadores de diferentes áreas, o que a nanotecnologia significava para eles. Não houve uma única resposta igual. Neste estudo, utilizaremos o conceito da ISO/TC 299, que é bastante amplo e bem aceito na comunidade científica. A definição dada pelo ISO/TC 229 não considera apenas materiais em escala inferior a 100 nanômetros, para eles nanotecnologia é: "entendimento e controle de matérias e processos em escala nanométrica, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros, em uma ou mais dimensões onde o surgimento de fenômenos dependentes do tamanho usualmente propicia novas aplicações"; além de "utilização das propriedades de materiais em escala nanométrica que diferem das propriedades dos átomos individuais, moléculas e matéria (bulk matter) para criar melhores materiais, dispositivos e sistemas que explorem estas novas propriedades".

De qualquer maneira, independente do conceito, materiais nanoestruturados podem exibir novas propriedades térmicas, mecânicas,

magnéticas, ópticas, entre outras, e apresentam grande área de superfície em relação à massa, permitindo alta capacidade de funcionalização, e ampla aplicação em diferentes setores, entre outros, o setor têxtil, de tintas, automotivo, agricultura, meio ambiente e biomedicina (Mody et al., 2010; Falleiros et al., 2011; Brakmane et al., 2012).

Na biomedicina, a utilização de nanomateriais passa por grande desenvolvimento, principalmente nas áreas de diagnóstico e entrega de fármaco (Gmeiner & Ghosh, 2015). Esses avanços foram obtidos por meio do uso de diferentes tipos de nanomateriais, incluindo nanopartículas metálicas (Xu et al., 2004).

1.2. Nanopartículas metálicas

Desde o trabalho pioneiro de Michael Faraday onde foi relatado um estudo sistemático sobre a síntese e cores de ouro coloidal (Faraday et al., 1857), milhares de artigos científicos foram publicados sobre a síntese de nanopartículas metálicas.

Nanopartículas metálicas apresentam características interessantes em suas propriedades ópticas que estão associadas ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície, que por sua vez depende do diâmetro e forma das nanopartículas. Essas características estão presentes em metais com elétrons livres (como Au, Ag, Cu e metais alcalinos) e dependendo do tamanho da nanopartícula provocam mudanças em suas cores. (Liz-Marzán, 2004). Atualmente, as nanopartículas metálicas mais estudadas são as de óxido de titânio, ferro, prata e ouro (El-Ansary et al., 2009).

1.3. Nanopartículas de ouro

Embora nanopartículas de ouro representem uma importante área da nanociência e nanotecnologia moderna, nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs) já são conhecidos há milênios (Li et al., 2014). De fato, o elemento ouro provoca fascínio desde a antiguidade, e desde então, não só o ouro na sua forma macroscópica, mas também, nanopartículas de ouro são utilizadas na fabricação de peças de ouro. Elas têm sido bastante estudadas por sua estabilidade e eficiente absorção de luz, e estão sendo exploradas na medicina para uso em biossensores no diagnóstico de doenças e como veículos para entrega de drogas (Cancino et al., 2013).

Com o desenvolvimento atual da nanotecnologia, a utilização do ouro na medicina, principalmente em estudos envolvendo diagnósticos e terapias do câncer, têm se desenvolvido rapidamente nos últimos anos. De fato, nanopartículas de ouro, graças ao seu tamanho e propriedades, são úteis em uma gama variada de aplicações biológicas, tais como: agente de entrega de drogas, terapia gênica, agente de contraste em tomografia computadorizada, bioimagens, entre outros (Mena et al., 2013).

Nanopartículas de ouro apresentam como grande vantagem a biocompatibilidade, síntese relativamente simples, o controle do tamanho das nanopartículas, facilidade de modificação química de sua superfície, assim como de caracterização devido à presença de uma banda de absorção associada à ressonância dos plasmons superficiais (Jain et al., 2007). Ademais, uma das mais importantes propriedades das AuNPs é sua capacidade de absorver energia a partir de uma fonte de campo magnético em oscilação ou irradiação por laser na janela de infravermelho próximo,

dissipando esta energia localmente e seletivamente destruindo células tumorais ou agregados tóxicos (como por exemplo agregados de β -amilóide). Este efeito tem sido usado como um agente para terapia fototérmica (Mena et al., 2013).

Afora o que foi colocado acima, nanopartículas de ouro são notáveis para aplicações biomédicas, por que: 1) permanecem longo tempo na circulação sanguínea; 2) podem acumular-se em locais de interesse por meio do efeito permeabilidade aumentada e retenção (EPR) ou por modificação da superfície com revestimentos específicos; 3) a sua funcionalização é simples uma vez que as suas características estruturais permitem que sejam utilizadas como nanocarreadores de drogas, DNA ou RNA; 4) podem combinar funcionalidades tanto de agentes de contraste como agentes terapêuticos em uma única nanopartícula (Li et al., 2014). De fato, nanomateriais de ouro foram os primeiros a serem utilizados como eficientes agentes teragnósticos (o termo surgiu para materiais que combinam funcionalidades de agentes de contraste e terapêuticos concomitantemente) que combinam as funções de imagem e fototerapia (Li et al., 2014).

Vale lembrar que, nanopartículas de ouro para serem utilizadas na biomedicina devem apresentar como principal característica a estabilidade, já que determinados ambientes fisiológicos exibem concentrações séricas e iônicas altas que podem alterar a estabilidade dos ligantes da nanopartículas, levando à agregação das mesmas, sendo que a repulsão eletrostática muitas vezes não é capaz de evitar essa agregação (Dreaden et al., 2011). A estabilidade das nanopartículas pode ser obtida por meio da cobertura de sua superfície com substâncias de revestimento (Sperling et al., 2010). Estas substâncias também podem auxiliar na ligação de outras moléculas, tais como

peptídeos, oligômeros, biopolímeros, entre outros, para que as nanopartículas de ouro possam ser endereçadas a alvos específicos.

Um dos estabilizadores ou coberturas para proteção de nanopartículas de ouro mais comumente utilizado é o citrato, que estabiliza as nanopartículas de ouro por meio de estabilidade eletrostática mútua (Brewer et al., 2005; Nagarajan, 2008). É importante notar que sob condições fisiológicas, o citrato é metabolizado no fígado, músculo esquelético e no córtex renal (Daniel & Astruc, 2004). Sua biocompatibilidade também ocorre em condições patológicas, como observado por Kramer e colaboradores (2003), os quais demonstraram que o citrato pode ser depurado pelo fígado mesmo em pacientes cirróticos; e por Bauer e colegas (2005), os quais fizeram a mesma observação para o sistema renal em pacientes com falha renal crônica. Estas observações mostram que o citrato não só pode funcionar estabilizando as nanopartículas, como também ter alta biocompatibilidade (Zheng et al., 2013).

1.4. Nanomateriais e nanotoxicologia

Diversos parâmetros, como tamanho, carga, forma, composição, área de superfície e volume modificam as propriedades físico-químicas da matéria quando em escala nanométrica, podendo tornar os nanomateriais altamente reativos e desestabilizar a homeostase dos sistemas biológicos (Schrand et al., 2010). Em geral, quanto menor um nanossistema, maior a proporção de átomos expostos em sua superfície capazes de reagir com o meio biológico. Estima-se que apenas 1% dos átomos de uma micropartícula situa-se em sua superfície, enquanto aproximadamente 10% dos átomos estão expostos em uma nanopartícula de 10nm (Jones & Grainger, 2009).

A nanotoxicologia explora os efeitos nocivos da interação entre um nanomaterial e um sistema biológico, por meio da avaliação de integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, identificação de corpos apoptóticos, danos ao material genético e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tanto a nível celular quanto tecidual (Singh et al., 2010). Se um nanomaterial não apresenta toxicidade significativa *in vitro* na dosagem ideal para determinada aplicação biomédica, então ele é testado em modelos *in vivo* e posteriormente em testes clínicos em humanos (Mahmoudi et al., 2011).

Uma questão relevante na biomedicina relacionada com o uso de nanopartículas, principalmente devido a seu tamanho e forma, é sua capacidade de penetração através de barreiras biológicas, tais como membranas celulares e até mesmo a barreira hematoencefálica.

Nanopartículas podem interagir e entrar nas células por dois mecanismos principais, endocitose e penetração direta pela membrana. Por endocitose, as nanopartículas são internalizadas por endossomas, e ficam acumuladas em vesículas. Por outro lado, nanopartículas, principalmente as catiônicas, passam através da membrana celular gerando poros, o que contribui para a citotoxicidade da célula (Riveros et al., 2013).

Em função dessa capacidade de interação com sistemas biológicos, da capacidade de transpassar e interagir com membranas biológicas e outros, juntamente com as amplas aplicações de nanopartículas de ouro em biologia e medicina, a citotoxicidade de AuNPs tornou-se uma das preocupações mais importantes (Du et al., 2012). Assim, é imperativo que se considere e avalie os seus efeitos tóxicos sobre diferentes tipos celulares, principalmente antes de sua aplicação na biomedicina.

2. Justificativa

Considerando a possibilidade de utilização de nanopartículas de ouro no transporte de medicamentos até ao tecido alvo, o Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, juntamente com os demais membros da Rede de Nanobiotecnologia, desenvolveu nanopartículas de ouro recobertas com citrato para serem utilizadas em aplicações biológicas.

Assim, não só a síntese, mas também a caracterização, estabilidade coloidal e a determinação da citotoxicidade dessas nanopartículas justificam este estudo, por meio do qual se espera poder contribuir no desenvolvimento de novas formulações para serem utilizadas como transportadores mais eficientes de fármacos e/ou agentes de contraste para imageamento, terapia fototermal, entre outras possibilidades.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Diante do exposto anteriormente este estudo teve como objetivo principal caracterizar e avaliar a toxicidade de nanopartículas de ouro recobertas com citrato.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar as nanopartículas de ouro recobertas com citrato quanto a aspectos físico-químicos;
- avaliar a estabilidade das nanopartículas de ouro recobertas com citrato ao longo do tempo sob três diferentes condições de temperatura de armazenamento;
- avaliar *in vitro* a toxicidade das nanopartículas de ouro recobertas com citrato sobre fibroblastos murinos, por meio do ensaio do MTT;
- avaliar em tempo real a dinâmica da proliferação celular de fibroblastos murinos submetidos a nanopartículas de ouro recobertas com citrato.

4. Material e Métodos

4.1 Equipamentos, Reagentes e Materiais de Uso Geral

Para este estudo foram utilizados os equipamentos, os reagentes e materiais de uso geral ilustrados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Lista de equipamentos

Equipamentos	Modelo	Fabricante
Agitador Magnético	Q221M	Quimis, BRA
Autoclave	Vitate 12	Cristófoli, BRA
Balança Analítica	AA200	Denver Instrument, USA
Banho Maria	240-2	J. Prolab, BRA
Câmera Digital	3.0MP	Live Resolution, BRA
Centrifuga de Bancada	Excelsa Baby	Fanem, BRA
Espectrofotômetro	Spectramax M2	Molecular Devices, USA
Estufa	TLZ 10	DeLeo, BRA
Fluxo Laminar	CFLV 12	Veco, BRA
Incubadora de CO ₂	3425	Thermo S. Inc., USA
Microscópio de Luz Invertido	Ck 2	Olympus. JPN
Microscópio Eletrônico de Transmissão	JOEL1011	JOEL, JPN
Refrigerador	DC39	Eletrolux, BRA
Zetasizer	ZS90	Malvern/ Reino Unido

Tabela 2 - Lista de Reagentes

Reagente	Fabricante
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azul Trypan	Sigma-Aldrich Co., USA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., USA
DMSO	Mallinckrodt Chemicals, USA
DMEM	Gibco, USA
Etanol 98 ^o GL	Sigma-Aldrich Co. USA
MTT	Invitrogen, USA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
Tripsina-EDTA	Gibco, USA

Tabela 3 - Lista de material de uso geral

Material	Fabricante
Criotubos	TPP, CHE
Filtro para Seringa (0,22 µm)	TPP, CHE
Frascos de Cultura (25 cm ² e 75 cm ²)	TPP, CHE
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser & Son, USA
Micropipetas	Gilson. Inc., USA
Micropipeta Multicanal	Gilson. Inc., USA
Microplacas (96 poços)	TPP, CHE
Ponteiras para Micropipetas	Axygen, USA

4.2. Preparação das nanopartículas de ouro recobertas com citrato

Nanopartículas de ouro recobertas com citrato (AuNPs) foram sintetizadas e cedidas pela Profa. Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, sendo que o procedimento empregado para síntese teve como base o método clássico de Turkevich (1951). Esse método padrão consiste na redução a 100 °C de uma solução cloridrato de ouro utilizando como redutor o citrato.

Desse modo, neste estudo a síntese das nanopartículas de ouro, resumidamente, consistiu no aquecimento de 100 mL de uma solução de HAuClO_4 , 0,09 mM, até a ebulição, quando se adicionou-se a ela 1 mL de solução de ácido cítrico 1%. Essa solução foi mantida em aquecimento, em uma placa aquecedora, com controle de temperatura por mais 20 min. Após resfriamento, as nanopartículas foram lavadas com água deionizada e concentradas em célula de ultrafiltração. A seguir, ajustou-se o pH da amostra para aproximadamente 7 com soluções de HCl e NaOH 0,01 M. A suspensão foi filtrada em membrana de celulose regenerada de 0,22 μm , e o teor de ouro foi então analisado por espectrofotometria de absorção atômica; este demonstrou ser de 0,19 mg/mL.

4.3. Caracterização e avaliação da estabilidade coloidal das nanopartículas de ouro recobertas com citrato

Para determinar a forma e o tamanho médio das nanopartículas de ouro recobertas com citrato, a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada.

Para tal, alíquotas de 20 μL da formulação diluídos em 980 μL de água Milli-Q foram colocadas em telinhas de cobre de 300 mesh previamente cobertas com resina Formvar® e deixadas a secar overnight dentro de placas de Petri, sendo depois analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão a 80 KV (JEOL 1011).

Para a determinação do tamanho médio da população de nanopartículas, 400 imagens de nanopartículas foram avaliadas quanto ao seu maior diâmetro no Software de Análises de Imagens Image ProPlus™. A avaliação do tamanho médio das nanopartículas foi realizada somente nas imagens de MET, pois estas imagens apresentam a menor distorção do objeto avaliado, em comparação com as outras técnicas de análise microscópica.

Como parâmetro complementar à caracterização das AuNPs, o espectro de absorvância da amostra, em diferentes concentrações de ouro (0,07 a 35 $\mu\text{g/mL}$), foi obtido utilizando-se o espectrômetro. Para tanto, uma alíquota de 150 μL das amostras foram colocadas em microplacas de cultura de 96 poços. As nanopartículas foram então excitadas a um comprimento de onda de 360 nm a 750 nm. O espectro de absorvância foi obtido no espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA) sendo captada pelo software SoftMax pro 5.2©.

Para os testes de avaliação da estabilidade coloidal, as variáveis como o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta (Ptz) foram analisadas logo após o preparo (tempo 0).

Para tanto, a amostra foi separada em alíquotas de um (1) mL que foram mantidas em diferentes temperaturas tais como: no refrigerador a 4 °C; sob a bancada de laboratório a temperatura ambiente, aproximadamente 30 °C e em estufa seca a 37 °C. As medições foram realizadas semanalmente no primeiro mês, depois passou a ser quinzenais nos dois meses seguintes e então mensalmente até completar 221 dias. As amostras estavam em quintuplicata, e os dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersão (PDI) foram obtidos por dispersão dinâmica da luz (DSL) e o potencial zeta (Ptz) foi obtido por dispersão de luz eletroforética em Zetasizer (Zetasizer, ZS90). Os dados referentes ao DH foram realizados em ângulo de medição de 90° e são apresentados por dispersão numérica.

4.4. Linhagem celular

Neste estudo utilizou-se como modelo *in vitro* uma linhagem celular de fibroblastos murinos, células NIH-3T3 (ATCC® CRL-1658™). Essa linhagem foi estabelecida a partir de fibroblastos de embriões de camundongo NIH Swiss e é constituída de células que apresentam inibição de contato, ou seja, o contato físico entre elas dispara sinais químicos que inibem a mitose (ATCC, 2015).

4.4.1 Manutenção e propagação das células

Alíquotas de células em concentração de 2×10^6 células/mL eram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37 °C.

Imediatamente após o descongelamento, as células eram transferidas para frascos de cultura de 25 cm² (TPP, CHE) contendo meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM (GIBCO, Auckland, NZ), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Auckland, NZ ou Gibco, USA) e 1% de antibiótico PenStrep, composto por penicilina, 100U/ml, e estreptomicina, 100 µg/ml (GIBCO, Auckland, NZ ou Gibco, USA), e tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich Co., USA), sendo o pH 7,4, ajustado pela adição de HCl e mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂ em ar, a umidade saturada e a temperatura de 37 °C.

Para o estabelecimento de subculturas, uma vez atingida 80 - 90% de confluência, as células eram desprendidas do fundo dos frascos de cultura por tratamento com solução de tripsina de 0,125%/EDTA 0,02% (GIBCO, USA, ou GIBCO, Auckland, NZ), por três minutos a 37 °C. Em seguida, de modo a inativar a enzima tripsina, era acrescentado aos frascos de cultura contendo as células três mililitros de meio de cultura. Essa solução era centrifugada (Excelsa baby/Fabricante Fanem, BRA) a 175 g, por cinco minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células eram então lavadas em um (1) mL de meio de cultura.

Antes de se repassar as células para novos frascos de cultura, fazia-se a contagem das células viáveis. Para tal 10 µL da suspensão celular eram adicionados a 90 µL de solução de Azul de tripan (Sigma-Aldrich Co., USA), um corante capaz de penetrar através da membrana plasmática de células inviáveis. Dez microlitros desse preparado eram aplicados em uma câmara de Neubauer (1/10 mm, Bright-line, Boeco Germany) para a contagem das células

viáveis. A concentração de células viáveis era determinada de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

Após a contagem, 10^4 células eram transferidas para novos frascos de cultura (TRP, Trasadingen, SUI) e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.5. Determinação da citotoxicidade das nanopartículas de ouro recobertas com citrato sobre células da linhagem NIH-3T3

A avaliação da citotoxicidade induzida pelas nanopartículas de ouro recobertas com citrato sobre as células NIH-3T3 foi realizada por meio do ensaio do brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), conhecido como ensaio do MTT, conforme descrito por Mosmann (1983). Este ensaio tem como base a capacidade das enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias, em converter o MTT, em um composto conhecido como formazan, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria. Como a produção de formazan pode ser correlacionada à presença de desidrogenases ativas, esse ensaio, frequentemente utilizado para avaliar a citotoxicidade induzida por diferentes estímulos, permite quantificar a viabilidade e a proliferação celular.

Para este ensaio, 5×10^3 células, coletadas a partir da terceira até quinta passagem de subculturas e confluência celular entre 60-85%, eram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas nas condições descritas no item 4.4.1 por 24 horas. Após este período, o meio de cultivo era retirado, realizada uma lavagem com PBS e então as células eram expostas às nanopartículas de ouro

recobertas com citrato em diferentes concentrações de ouro diluído em meio de cultura (0,03 µg/mL; 0,07 µg/mL; 0,14 µg/mL; 0,27 µg/mL 0,55 µg/ml; 1,09 µg/ml; 2,19 µg/mL; 4,37 µg/mL; 8,75 µg/ml; 17,5 µg/mL e 35 µg/mL). Como controle negativo de citotoxicidade foram utilizadas células sem tratamento algum, apenas mantidas no meio de cultivo. Essas células eram incubadas por 24 ou 48 horas. Após esse tempo, o meio de cultura era substituído por 150 µL de uma solução constituída de 15 µL MTT e 135 µL de meio de cultura e as células eram novamente incubadas a 37 °C, por mais três horas. Em seguida, a solução contendo MTT era removida e 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO, Mallinckrodt Chemicals, USA) eram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. A quantificação do formazan era realizada pela medida do espectro de absorbância, com comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA) conjugado à leitora de microplacas. Este ensaio foi realizado por três vezes de forma independente, cada uma delas em triplicata.

4.6. Dinâmica da proliferação de células da linhagem NIH-3T3 na presença de nanopartículas de ouro cobertas com citrato

Este ensaio foi realizado de modo a avaliar se as células na presença das nanopartículas de ouro mantinham a capacidade proliferativa. Para isso, utilizou-se o sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA). Esse sistema abrange três estações integradas, um instrumento de RTCA, que é mantido dentro de uma incubadora de cultura de células e que utiliza placas com microelétrodos de ouro para monitorar a proliferação celular em tempo real, por meio da detecção automatizada do índice de biomassa celular determinado pela

impedância eletrônica. Os resultados são apresentados de acordo com o tempo em função do índice de biomassa celular.

Para esse ensaio, primeiramente eram colocados 100 µL de meio de cultura em placas E-Plate16 (Roche/ACEA) para obter os valores basais. Uma vez estabilizado o sistema, 5×10^3 células, sem tratamento algum, foram colocadas em placas E-Plate16 (Roche/ACEA) às quais se adicionou 100 µL de meio de cultura. As placas foram mantidas por 30 minutos no fluxo laminar, para a decantação das células e depois colocadas no equipamento de RTCA. O conjunto era levado à incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂ em ar, a umidade saturada e a temperatura de 37 °C.

A proliferação celular era analisada durante 24h. Depois desse tempo o sistema de detecção era interrompido, o meio de cultura desprezado e as células eram expostas ou não às nanopartículas de ouro recobertas com citrato, nas concentrações de 0,035 µg/mL, 0,35 µg/mL e 35 µg/mL. Como controle utilizaram-se células sem tratamento e poços sem células, porém com as mesmas concentrações de AuNPs utilizadas junto às células assim como poço contendo apenas o meio de cultura. As placas eram colocadas novamente no instrumento de RTCA que foi levado a incubadora de células. Ao longo de 216 horas (nove dias), o valor de impedância na placa era mensurado a cada 30 minutos, sendo que a dinâmica da proliferação celular (índice celular) foi analisada utilizando-se o software RTCA (Roche/ACEA). Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 - Análises estatísticas

Os dados obtidos nos diferentes ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os grupos, foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,01$. A análise dos dados foi realizado por meio do *software GraphPad Prism® 5*.

5. Resultados

As nanopartículas de ouro recobertas com citrato foram caracterizadas quanto ao seu tamanho médio, espectro de absorção, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e quanto ao potencial zeta. Os resultados dessas variáveis estão expressos nas figuras 01 a 06.

A medição das nanopartículas mostrou que elas têm diâmetro médio igual a 35 nm, conforme ilustrado na figura 01, e elas se apresentam homogêneas, principalmente esféricas na forma, com algumas nanopartículas elipsóides presentes.

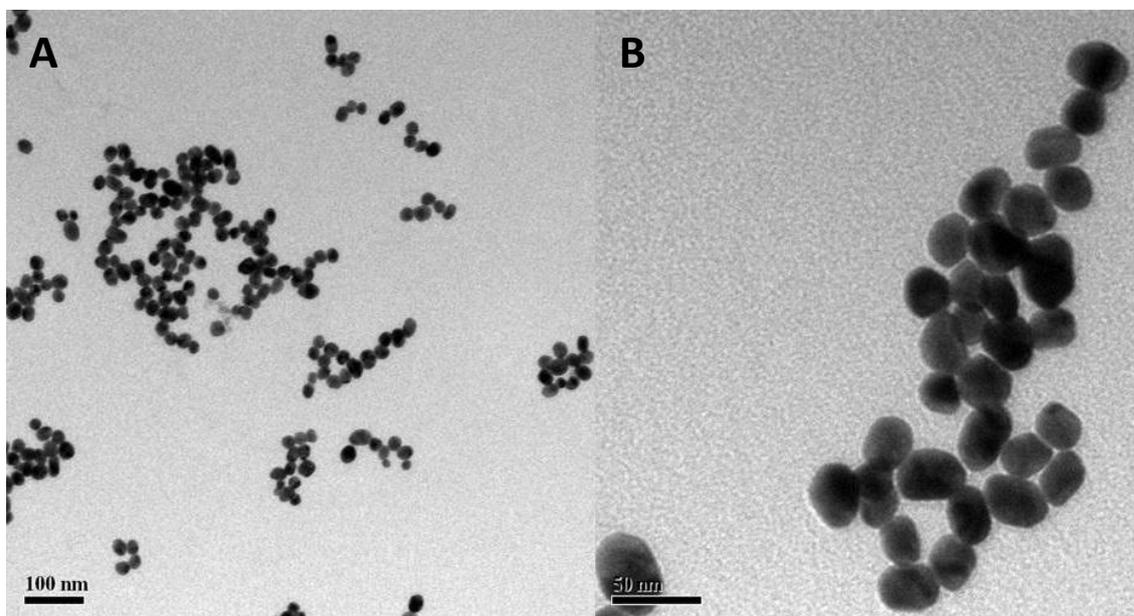


Figura 01. Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando nanopartículas de ouro recobertas com citrato. Barras correspondem a 100 nm (A) e 50 nm (B).

Como se pode observar na figura 02, o pico de absorbância das nanopartículas de ouro recobertas com citrato ocorre a 530 nm e a intensidade de absorção cresce de acordo com a concentração de nanopartículas.

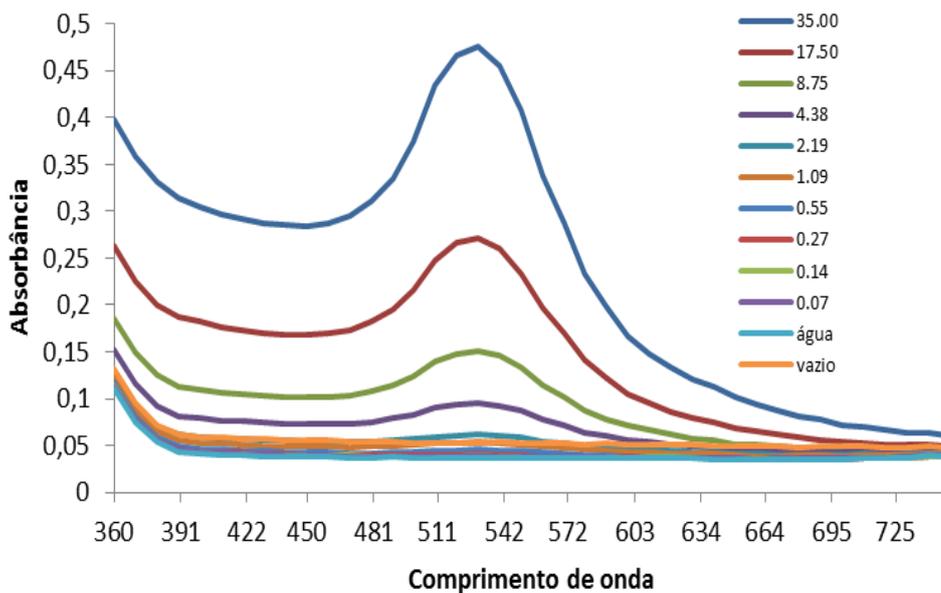


Figura 02. Espectros de absorvância de diferentes concentrações (0,07 a 35 $\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de ouro recobertas com citrato.

Na figura 03, observa-se que sob a condição de temperatura de armazenamento de 37 °C, as nanopartículas apresentam inicialmente diâmetro hidrodinâmico inferior a 50 nm e que este se conserva ao longo do tempo. Já quando estocadas à temperatura ambiente e à 4 °C elas apresentam inicialmente diâmetro hidrodinâmico superior a 50 nm, contudo, ao longo do tempo ocorre um aumento nos valores deste parâmetro, chegando a apresentar diâmetro hidrodinâmico superior a 250 nm depois de 200 dias a 4 °C.

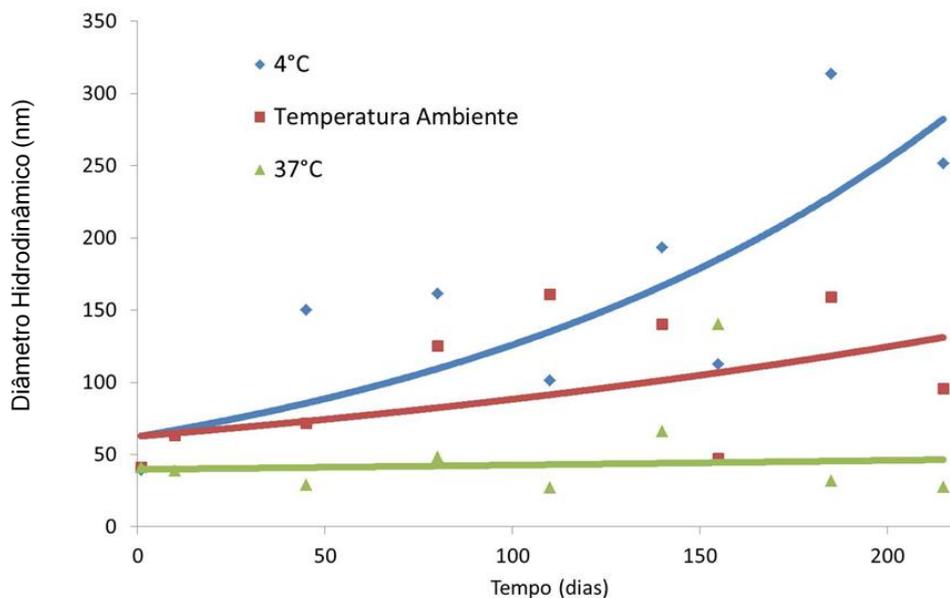


Figura 03. Valores do diâmetro hidrodinâmico (DH) das nanopartículas de ouro recobertas com citrato ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas de armazenamento. Valores determinados por meio do espalhamento dinâmico de luz.

Como ilustrado na figura 04, sob uma temperatura de armazenamento de 37 °C, as nanopartículas apresentam inicialmente índice de polidispersão (IPD) igual 0,64. A análise estatística mostrou que a temperatura e o tempo não alteram esse índice.

O potencial zeta (P_{tz}) inicial é igual a -40 mV (figura 05), ele não se altera ao longo do tempo, mesmo quando se varia a temperatura, mostrando que a carga de superfície das nanopartículas é negativa.

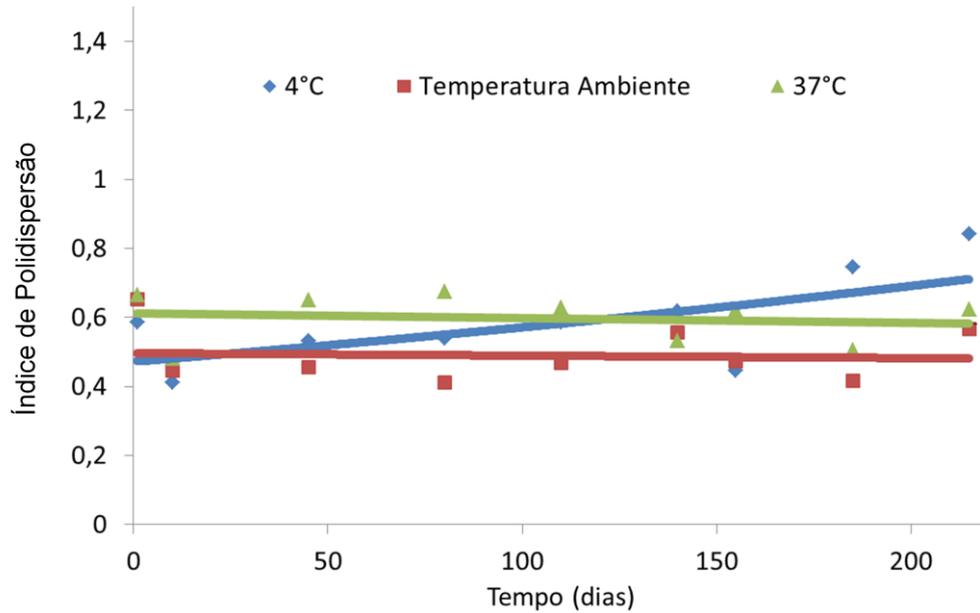


Figura 04. Valores do índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas de ouro recobertas com citrato ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas de armazenamento. Valores determinados por meio do espalhamento dinâmico de luz.

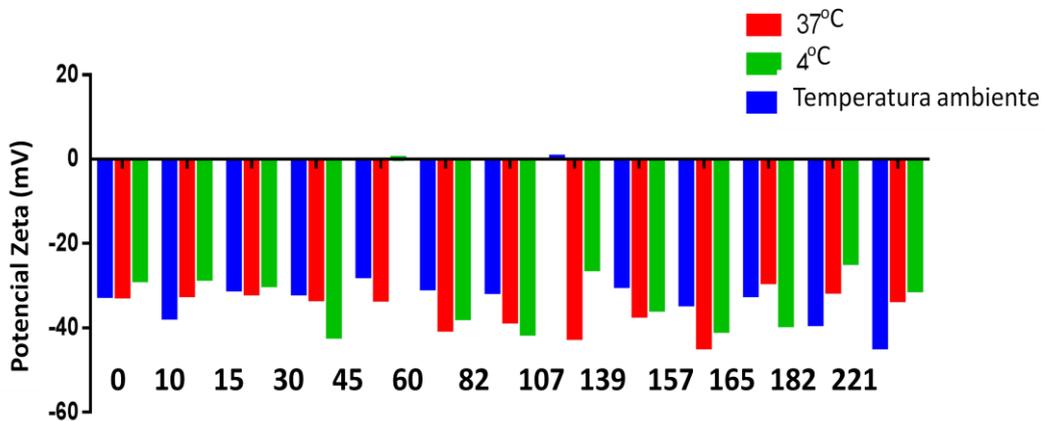


Figura 05. Valores do potencial zeta (Ptz) das nanopartículas de ouro recobertas com citrato, ao longo do tempo, sob diferentes temperaturas de armazenamento. Valores determinados por meio do espalhamento dinâmico de luz.

Após três meses de armazenamento, a alteração da polidispersão das nanopartículas de ouro recobertas com citrato pôde ser também observada na

formação de precipitados, que se depositaram no fundo dos tubos das amostras armazenadas à temperatura ambiente e à 4 °C, o que não ocorreu quando acondicionada a 37 °C, como mostra a figura 06.

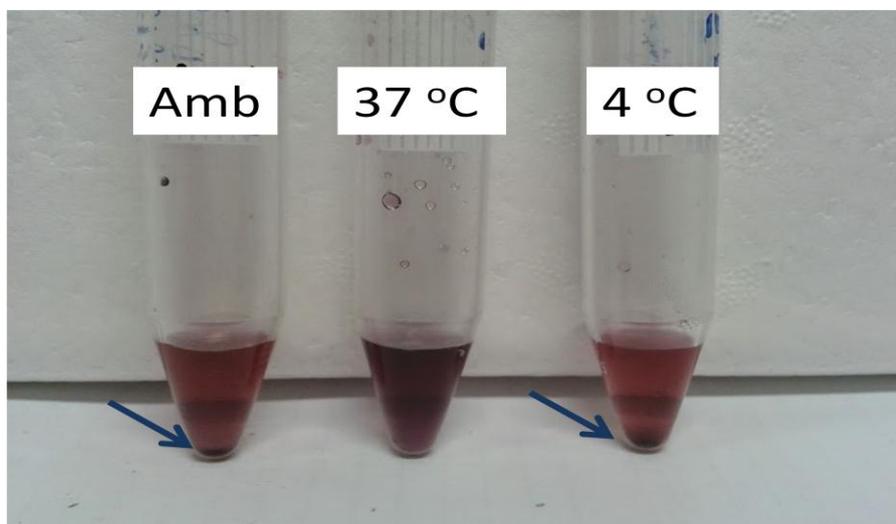


Figura 06. Amostras de nanopartículas de ouro recobertas com citrato após 90 dias de armazenamento a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (Amb), 37 °C e 4 °C. As setas ressaltam a presença de precipitado no fundo dos tubos.

Para avaliar a toxicidade das nanopartículas de ouro recobertas com citrato realizaram-se ensaios de MTT. Para a análise dos dados, considerou-se como 100% a média de células vivas no grupo sem tratamento, ou seja, sem AuNPs . O resultado está expresso na figura 07.

Nessa figura observa-se que as nanopartículas de ouro recobertas com citrato não são tóxicas para as células das linhagens NIH-3T3 qualquer que seja a concentração de ouro nelas contido, seja por 24 ou 48 horas de exposição.

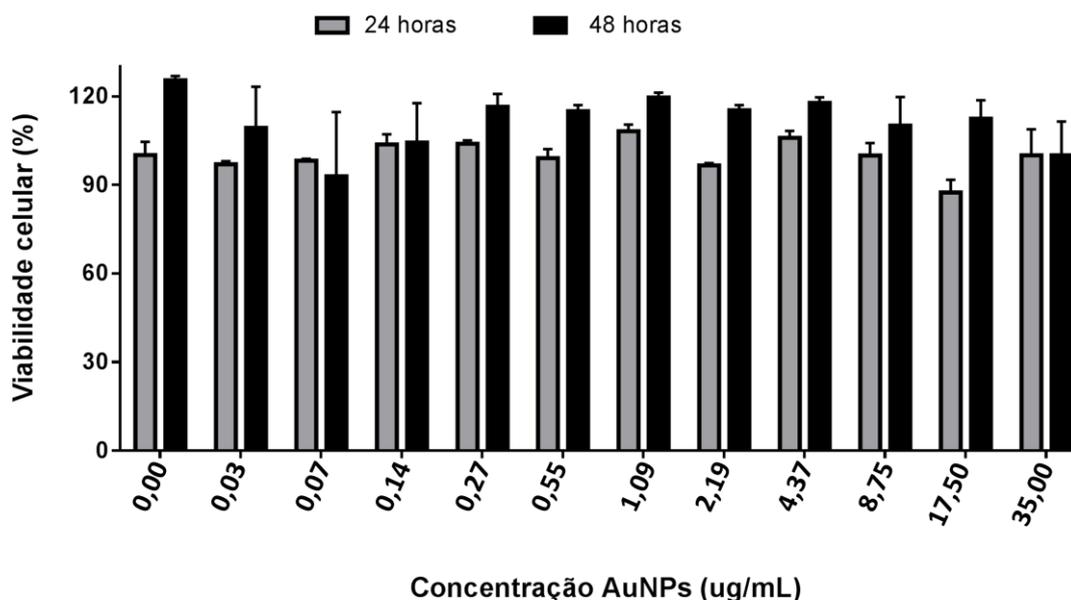


Figura 07. Viabilidade de células da linhagem NIH-3T3 após 24 e 48 horas na presença de nanopartículas de ouro recobertas com citrato, determinada por meio do ensaio de metabolização de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio).

A fim de avaliar se as células da linhagem NIH-3T3 expostas a nanopartículas de ouro recobertas com citrato mantinham a capacidade proliferativa foi realizada o ensaio RTCA. Na figura 08 pode-se observar que durante o período de adaptação, ou seja, durante as vinte e quatro horas que precediam a incubação com as AuNPs, todos os poços que continham células mostraram curvas de proliferação celular similares. Após este período, com o início da exposição das células as diferentes concentrações de AuNPs, observa-se que até 120 horas (cinco dias) não há diferença significativa no índice celular para todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle de células incubadas apenas com meio de cultivo.

No entanto, após cinco dias de exposição às AuNPs, as células que estavam em contato com nanopartículas de ouro na concentração de 35 µg/mL, passaram a ter o índice celular diminuído significativamente quando comparado ao controle, o que não foi observado com as células expostas as concentrações de ouro de 0,035 e 0,35 µg/mL. Nestes últimos casos, as células apresentaram índices celulares estatisticamente similares as das células controle até 216 horas (nove dias). Já as células incubadas com a maior concentração áurea (35 µg/mL), permaneceram com queda significativa de sua proliferação celular até nove dias totais de exposição.

Vale ressaltar que, no mesmo experimento foram dispostos poços sem células, porém contendo AuNPs nas mesmas três concentrações em que as células foram expostas, e não foi observado nenhuma alteração de impedância nestes poços, como se pode observar na figura 08, as três linhas basais, indicando que a presença apenas das nanopartículas não causou qualquer interferência no experimento, até mesmo por um período longo de nove dias de incubação a 37 °C.

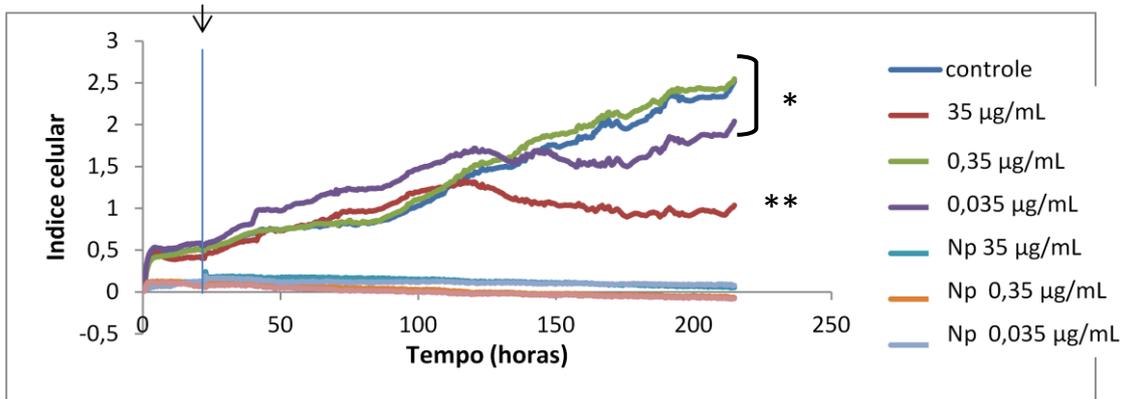


Figura 08. Índices celulares de fibroblatos murinos (NIH-3T3) em relação ao tempo de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas de ouro recobertas com citrato (AuNPs). Valores determinados por meio do ensaio RTCA. Controle foram células incubadas apenas com meio de cultivo. Np significa poço contendo apenas AuNPs nas concentrações indicadas em meio de cultivo (sem a presença de células). A barra transversal azul indica o fim do período de 24 h que precediam a incubação com as nanopartículas. A seta preta indica o início da exposição das células às AuNPs. * sem diferença significativa ($p < 0,05$) e ** com diferença significativa ($p < 0,05$).

6. Discussão

As propriedades físicas e químicas das nanopartículas de ouro têm sido alvo de intensas investigações nos últimos anos, mostrando o seu emprego em diferentes campos de aplicação, tais como na construção de biossensores, em sistema de liberação gradativa de drogas, catálise, bioimagens e outros (Costa, 2012, Li et al., 2014). Normalmente, essas nanopartículas são preparadas por redução química de um precursor de ouro, geralmente HAuCl_4 , e um agente redutor que pode ser um ácido orgânico, açúcar, aldeído, entre outros. Nas últimas décadas, embora diversas estratégias tenham sido desenvolvidas para preparar nanopartículas de ouro, o método de redução química com citrato tem se mostrado vantajoso, pois além de ser um método barato, é conhecido por produzir nanopartículas de ouro monodispersas, ou medianamente polidispersas, e esféricas, com considerável rendimento (Costa, 2012). Vale ressaltar que o tamanho das partículas é definido principalmente pela concentração de citrato de sódio presente no meio (Melo-Jr et al., 2012).

Os resultados deste trabalho mostram que a resposta óptica das nanopartículas metálicas sintetizadas com o citrato mostra que elas apresentam espectro de UV-vis bem definido, 530 nm, o que demonstra a formação de nanopartículas de ouro, com banda plasmônica característica (Keating et al., 1999). O efeito do tamanho quântico está envolvido quando o comprimento de onda de Broglie da valência dos elétrons é da mesma ordem que o tamanho da própria partícula. Neste caso, as partículas se comportam eletronicamente como quantum dots zero-dimensional (ou quantum boxes). Elétrons livremente móveis ficam presos e mostram uma frequência de oscilação coletiva característica da ressonância do plasma, dando origem ao

chamado banda de ressonância de plasmon (PRB) observado próximo a 530 nm. (Daniel & Astruc, 2004). Como esperado ocorreu uma maior absorbância de acordo com o aumento da concentração das nanopartículas de ouro.

Ao microscópio eletrônico de transmissão, a maioria das nanopartículas de ouro obtidas neste estudo, se apresenta principalmente com forma esférica e baixa dispersividade, com tamanho médio em torno de 35 nm. Embora, a forma e o tamanho de nanopartículas de ouro dependam de diversas variáveis do processo, de acordo com Zhu e colaboradores (2003), a produção de partículas com diâmetro médio de 12-50 nm, com uma camada passivante de fácil substituição em meio aquoso, é uma das vantagens do método de redução com citrato (Costa, 2012). Vale ressaltar que, imediatamente após síntese, nenhuma das soluções apresentava a formação de precipitados. A partir deste ponto, as soluções foram estocadas em diferentes temperaturas (4 °C, 37 °C e temperatura ambiente) e ao longo do tempo (até 221 dias), realizaram-se ensaios de modo a determinar a estabilidade das soluções.

Um desses ensaios foi a determinação do potencial zeta. Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem, e essa força supera a tendência natural à agregação. O valor ideal deve ficar acima de 30 mV positivo ou negativo. Neste trabalho o potencial zeta se mostrou negativo (aproximadamente -40 mV), com poucas alterações ao longo do tempo. Este potencial muito provavelmente é devido ao recobrimento das partículas com os íons de citrato, proporcionado pelos grupos carboxilas ancorados na superfície (íon citrato pode possuir até três cargas negativas provenientes da desprotonação de cada uma de suas três carboxilas), evitando a agregação das nanopartículas de ouro, o que é

interessante para que elas possam ser utilizadas em sistemas biológicos (Costa, 2012)

Além disso, é importante notar que os resultados demonstram que existe uma evidente relação, ao longo do tempo, entre a diminuição da temperatura e o aumento do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas formadas, sem que ocorram mudanças no potencial zeta das mesmas. A análise do tamanho de partículas e o índice de polidispersão (IPD) das soluções de nanopartículas de ouro foram obtidos pelo método de Dispersão dinâmica de luz (DLS). Esta técnica baseia-se no fato de que as partículas movem-se aleatoriamente sob o impacto das moléculas do solvente (nesse estudo era água) sobre a sua superfície. A frequência e a amplitude deste movimento, denominado browniano (movimento aleatório das partículas suspensas em um líquido ou gás, resultante da sua colisão com átomos ou moléculas no fluido), é dependente do tamanho da partícula e da viscosidade do solvente, ou seja, quanto menor a partícula, maior será a frequência do movimento browniano (Malvern, 2004). Desse modo, é possível acreditar que o aumento do diâmetro hidrodinâmico observado neste estudo esteja relacionado à diminuição do movimento browniano, e não à agregação das nanopartículas. Isso porque a diminuição da temperatura leva ao aumento da densidade da água que por sua vez leva à diminuição do livre caminho médio da partícula, além do fato de a temperatura em si influenciar no movimento das partículas em um fluido. Trabalho de Jung e colaboradores (2014), mostra que para algumas nanopartículas o raio hidrodinâmico das partículas era inversamente proporcional à temperatura. Nesse caso, a mudança do movimento browniano

em função da temperatura é percebida como aumento do diâmetro hidrodinâmico.

Os resultados do índice de polidispersão neste trabalho, os quais demonstram uma estabilidade ao longo do tempo, independentemente da temperatura, reforçam a hipótese acima levantada, pois seria de se esperar aumento daquele índice no caso de ocorrer agregação das nanopartículas.

Por outro lado, as explicações acima sobre a relação entre diminuição da temperatura e diminuição do movimento browniano também favorecem o aumento da interação (colisão) entre partículas, ao aumento da agregação e precipitação das mesmas. Esta hipótese está muito bem mostrada nos resultados da figura 06, aonde pode-se observar precipitados tanto nos colóides mantidos a temperatura ambiente, como nos estocados a 4 °C. O mesmo não acontece quando as nanopartículas em suspensão são mantidas a 37 °C. A estabilidade coloidal pode ser vista em termos da variação de energia livre em função da distância de separação das partículas em um sistema (Shaw, 1975). Essa teoria, conhecida como teoria DVLO (desenvolvida em 1940 por Derjaguin, Verway, Landau e Overbeek e cujo nome é formado pelas iniciais de seus criadores) fornece os fundamentos de um modelo quantitativo para as interações entre partículas e sugere que a estabilidade do sistema coloidal é determinada pela soma das forças atrativas e repulsivas, as quais ocorrem entre as partículas que interagem umas com as outras devido ao movimento Browniano (Shaw, 1975, Santos, 2011). A teoria DVLO sugere que uma barreira de energia resultante das forças atrativas e repulsivas impede duas partículas de se aderirem, no entanto, se as partículas se chocam com energia suficiente para superar essa barreira energética, a força atrativa as

aproximará a ponto de ocorrer uma forte adesão que pode ser irreversível (Quesada et al., 2002; Santos, 2011).

Obviamente, os resultados aqui obtidos não descartam a possibilidade de ambos os processos estarem acontecendo, e novos experimentos precisam ser realizados para esclarecer melhor estas questões.

Testes *in vitro* de novos nanomateriais são essenciais antes dos estudos *in vivo* e das aplicações biomédicas, para identificação de perigos e avaliação de riscos dos mesmos. Neste estudo, a possível citotoxicidade de nanopartículas de ouro (35 nm) recobertas com citrato foi avaliada utilizando-se como modelo uma linhagem de fibroblastos murino. Estudos anteriores utilizando nanopartículas de ouro com diferentes coberturas têm apresentado resultados, que em geral, mostram uma dependência em relação ao tamanho, tipo celular estudado e agente estabilizador. No entanto, até os nossos dias, o perfil toxicológico de nanopartículas de ouro permanece controverso (Fraga et al., 2013). Os resultados deste trabalho demonstram que quando se avalia a toxicidade por meio do ensaio de MTT nos tempos de 24 e 48 horas, não existe diferença na viabilidade celular das células incubadas com AuNPs independentemente da concentração utilizada, quando comparadas ao grupo controle. O mesmo resultado foi obtido quando se faz a análise de crescimento e viabilidade celular em tempo real. No entanto, para tempos a partir de aproximadamente 120 horas (cinco dias), como determinado por análise de RTCA, inicia-se um processo de diminuição do índice celular, na concentração mais alta utilizada neste estudo (35 µg/mL). O método de avaliação utilizado neste trabalho, não permite dizer, se está ocorrendo morte celular (efeito

citotóxico), ou parada de crescimento celular (efeito citostático) ou ambos. Pode-se afirmar, entretanto, que a diminuição do índice celular quando as células são tratadas com a mais alta concentração de AuNPs, não se dá por conta do longo tempo de permanência das mesmas em cultivo (até 216 horas), já que essa diminuição não acontece com células controle, ou incubadas com concentrações menores de nanopartículas, demonstrando que as condições de cultivo não influenciam nesse resultado. Cabe ressaltar aqui que não foi observada formação de precipitados no meio de cultivo durante o período estudado, indicando que as nanopartículas permaneceram estáveis nas condições estudadas. Lembrando que a temperatura de cultivo de 37 °C, provavelmente ajudou no processo de estabilidade.

Os resultados aqui obtidos demonstram claramente que o processo de toxicidade que ocorreu quando se utilizou concentrações mais altas de nanopartículas, se dá de forma lenta e contínua. A maioria dos estudos *in vitro* utilizam metodologias que necessitam avaliações em tempos determinados (caso do MTT), o que em geral leva a análises de períodos relativamente curtos. Uma das vantagens da utilização da técnica de RTCA é que possibilita realizar estudos de mais longo prazo, sem necessidade de interferir com o processo de crescimento celular.

Vetten e colaboradores (2013), utilizando índice celular determinado por RTCA, observaram que quando foram utilizadas nanopartículas de ouro recobertas com citrato, mostraram que células de epitélio bronquiolar (BEAS-2B), células ovarianas de hamster (CHO) e renais (HEK 293) apresentam sensibilidades diferentes quando incubadas com AuNPs e esta sensibilidade é dependente da concentração e tamanho das partículas utilizadas. No entanto,

as diferentes células foram analisadas por tempos diferentes, sendo algumas monitoradas por tempos mais curtos (até 36 horas) e outras tempos mais longos (até 72 horas). É possível que se as análises para todas as linhagens celulares tivessem sido realizadas por tempos mais longos, assim como no mesmo tempo para todas, pudesse ter sido observado resultados diferentes dos anteriores. Em outras palavras, é possível que no longo prazo (em tempos maiores de incubação), para concentrações maiores, não haveria diferença na sensibilidade entre as células.

Os estudos aqui realizados não avançaram em relação às causas e mecanismos envolvidos na toxicidade causada por nanopartículas de ouro recobertas com citrato na linhagem celular avaliada, com tempos de incubação prolongados, quando em concentrações maiores. No entanto, a literatura científica na área apresenta algumas possíveis vias de toxicidade.

As possíveis causas envolvem desde o tipo de cobertura, passando pela forma, tamanho e concentração das nanopartículas. É pouco provável que a quantidade de citrato presente na superfície das nanopartículas possa ser um fator de toxicidade. Uboldi e colaboradores (2009) utilizando células epiteliais humanas (não endoteliais) demonstraram que apenas quando se utiliza concentrações de citrato muito alta na superfície das nanopartículas de ouro observa-se alguma toxicidade. Além da concentração de citrato utilizada nesse trabalho ser relativamente baixa, citrato é utilizado como anticoagulante para tratamento de, por exemplo, doenças renais agudas, sem que cause citotoxicidade celular ou tecidual. Ademais, o trabalho de Uboldi e colaboradores não foi corroborado quando outro grupo de pesquisadores (Freese et al., 2012) utilizando as mesmas nanopartículas realizaram ensaios

com células endoteliais. Obviamente, a hipótese não pode ser descartada para o modelo deste estudo sem que novos ensaios sejam realizados. Do ponto de vista da forma das nanopartículas, a literatura demonstra claramente que dentre os nanomateriais a base de ouro, ou mesmo de outros tipos de metais, os que apresentam forma mais próxima de esferas, são as menos citotóxicas (Boisselier & Astruc, 2009).

Não está claro na literatura, se diferentes tamanhos podem causar mais ou menos citotoxicidade. No entanto, a maioria dos artigos advogam que nanopartículas muito pequenas, menores que 5 nm, normalmente são mais citotóxicas, apesar de haver trabalhos indicando o contrário (Chen et al.; 2009). Novamente, no geral, estes trabalhos obtêm dados em um intervalo de um ou dois dias de incubação, o que não necessariamente é suficiente para se observar alterações celulares. No caso deste estudo, como as nanopartículas tinham diâmetro médio de 35 nm, o tamanho não dever ser a principal causa da toxicidade observada em altas concentrações dessas nanopartículas. No entanto, vale chamar atenção ao fato de que, no geral, as nanopartículas utilizadas têm índice de polidispersão variável, e não existe controle de qual (is) tamanho(s) estariam influenciando nos resultados.

Pode-se, com base nos resultados obtidos neste estudo, sugerir que a concentração, se não é o único fator, é uma causa direta da toxicidade observada. No entanto, como colocado anteriormente, não se pode inferir, com base nos resultados aqui apresentados, qual (is) mecanismo(s) está (ão) envolvido(s).

7. Conclusão

As Nanopartículas de ouro recobertas com citrato aqui avaliadas mantiveram suas características físico-químicas estáveis sob diferentes condições de temperatura de armazenamento por pelo menos três meses. Contudo, após este período, houve alteração destes parâmetros havendo, portanto, uma necessidade específica de acondicionamento à 37 °C destas nanopartículas. As AuNPs no geral foram bem toleradas pelas células, mas demonstraram ser capazes de alterar a proliferação celular nas concentrações mais altas apenas quando incubadas por períodos mais prolongados.

8. Referências Bibliográficas

BAUER, E.; DERFLER, K.; JOUKHADAR, C.; DRUML, W. Citrate kinetics in patients receiving long-term hemodialysis therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, 46: 903-907 (2005).

BRAKMANE, G.; WINSLET, M.; SEIFALIAN, A M. Systematic review: the applications of nanotechnology in gastroenterology. *Aliment. Pharmacy. Therap.*, 36(3): 213–21 (2012).

BREWER, S. H.; GLOMM, W. R.; JOHNSON, M. C.; KNAG, M. K.; FRANZEN, S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*, 21: 9303-9307 (2005).

BOISSELIER W. E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 38: 1759-1782 (2009).

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. *Quimica Nova* 37(3): 521-526 (2014).

CHEN, Y-S.; HUNG, Y-C.; HUANG, G.S. Assesment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.*, 4: 858-864 (2009).

COSTA, P.R. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro como ferramenta terapêutica e diagnóstica. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Belo Horizonte, 2012.

DANIEL, M-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, 104: 293-346 (2004).

DREADEN, E.C.; MACKEY, M.A.; HUANG, X.; KANG, B.; EI-SAYED, M.A.. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem. Soc. Rev.* 40(7): 3391–3404 (2011).

DU, L.; MIAO, X.; JIA, H.; GAO, Y.; LIU, K.; ZHANG, X.; LIU, Y. Detection of nitric oxide in macrophage cells for the assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles. *Talanta* 101: 11-15 (2012).

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: An overview. *J. Toxicol*, 2009: 1-9 (2009).

FALLEIROS, J. P. B.; BRANDIL, A. L.; FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, 8(1): 151-170 (2011).

FARADAY, M., The Bakerian Lecture – Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. Royal Soc. London*, 147: 145 (1857).

FRAGA, S.; FARIA, H.; SOARES, M.E.; DUARTE, J.A.; SOARES, L.; PEREIRA, E.; COSTA-PEREIRA, C.; TEIXEIRA, J.P.; DE LOURDES BASTOS, M., CARMO, H. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *J. Appl. Toxicol.*, 33(10): 1111-1119 (2013).

FREESE, C.; UBOLDI, C.; GILSON, M.I.; UNGER, R.E.; WEKSLER, B.B.; ROMERO, I.A. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.*, 9: 23-34 (2012).

GMEINER, W.H.; GHOSH, S. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnol. Rev.* 3(2): 111-122 (2015).

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

JONES, C.F.; GRAINGER, D.W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61 (6): 438-456 (2009).

JUNG, C.; LEE, J.; KANG, M.; KIM, S.W. Measurement of the temperature-dependent diffusion properties of nanoparticles by using fluorescence correlation spectroscopy. *J. Korean Phys. Soc.*, 65(7): 1083-1089 (2014).

KEATING, C.D.; MUSICK, M.D.; KEEFE, M.H.; NATAN, M.J. Kinetics and thermodynamics of Au colloid monolayer self-assembly: Experiments in surface and nanomaterials chemistry. *J. Chem. Education*, 76: 949-956 (1999).

KRAMER, L.; BAUER, E.; JOUKHADAR, C.; STROBL, W.; GENDO, A. Citrate pharmacokinetics and metabolism in cirrhotic and noncirrhotic critically ill patients. *Crit. Care Med.*, 31: 2450-2455 (2003).

LI, N.; ZHAO, P.; ASTRUC, D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. *Angew. Chem. Int.*, 53: 1756-1789 (2014).

LIZ-MARZÁN, L.M. Nanometals: Formation and color. *Materials Today*. 7(2): 26-31(2004).

MAHMOUDI, M.; SANT, S.; WANG, B.; LAURENT, S.; SEN, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63: 24-46 (2011).

MELO-JR, M.A.; SANTOS, L.S.S.; GONÇALVES, M-C.; NOGUEIRA, A.F. Preparation of silver and gold nanoparticles: a simple method to introduce nanotechnology into teaching laboratories. *Quimica Nova*, 35(9): 1-13 (2012).

MENA, J.F.; NEIRA-CARRILLO, A.; PEDRAM, M.Y.; KOGAN, M.J. Capping gold nanoparticles with modified chitosan polymers for biomedical applications. *J. Biomater. Tissue Eng.*, 3(1): 135-140 (2013).

MODY, V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci.*, 2(4): 282–289 (2010).

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65(1-2), 55-63 (1983)

NAGARAJAN, R. *Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization: American Chemical Society.* 996: 2-14 (2008).

QUESADA, M.P.; CALLEJAS, J.F.; HIDALGO, R.A. Interaction potentials structural ordering and effective charges in dispersions of charged colloidal particles. *Adv. Coll Interf. Sci.*, 325: 295-315 (2002).

RIVEROS, A.; DADLANI, K.; SALAS, E.; CABALLERO, L.; MELO, F.; KOGAN, M.J. Gold nanoparticle-membrane interactions: implications in biomedicine. *J. Biomater. Tissue Eng.*, 3: 4-21 (2013).

SANTOS, E.T. Inserção de nanopartículas metálicas em resina epóxi: estudos espectroscópicos. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

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

SINGH, N.; JENKINS, G.J.; ASADI, R.; DOAK, S.H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano reviews* 1:1-15 (2010).

SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.*, 368(1915): 1333-83 (2010).

SHAW, D.J. *Introdução à química dos coloides e de superfície.* Ed. Edgard Blucher Ltda, 1975.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLER, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday. Soc.*, 11: 55-75 (1951).

UBOLDI, C.; BONACCHI, D.; LORENZI, G.; HERMANN S M.I.; POHL, C.; BALDI, G.; UNGER, R.E.; KIRKPATRICK, C.J. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell line A549 and NCIH441. *Part. Fibre Toxicol.* 6: 18 (2009).

VETTEN, M.A.; TLOTLENG, N.; RASCHER, D.T.; SKEPU, A.; KETER, F.K.; BOODHIA, K.; KOEKEMOER, L-A.; ANDRAOS, C.; TSHIKHUDO, R.; GULUMIAN, M. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilized gold nanoparticles in three cell lines. *Part. Fibre Toxicol.*, 10: 50-65 (2013).

XU, X.; STEVENS, M.; CORTIE, M.B. In situ precipitation of gold nanoparticles onto glass for potential architectural applications. *Chem Mater.*, 16: 2259–2266 (2004).

ZHENG, Y.; XU, Z.; LIU, J.; QIAN, J.; YOU, H.; GU, Y.; HAO, C.; JIAO, Z.; DING, F. Citrate pharmacokinetics in critically ill patients with acute kidney injury. *PLOSone*, 8(6): e65992 (2013).

ZHU, T.; VASILEV, K.; KREITER, M.; MITTLER, S.; KNOLL, W. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptopropionic acid. *Langmuir* (2003).