



Universidade de Brasília



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO DA COROA PROTEICA EM
NANOPARTÍCULAS DE $MAGH-RH_2(H_2CIT)_4$ E SUA INTERAÇÃO
COM MACRÓFAGOS HUMANOS.**

WESKLY FEITOSA LAGO

**Trabalho de Mestrado apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, UnB.**

Orientadora: Sônia Nair Bão

Brasília, 2018

A Deus e a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer a pena!

Gratidão!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu criador e orientador... obrigada, Deus meu! Obrigada por sempre estar ao meu lado, orientando, dando forças e me guiando nessa estrada (vida) que as vezes parece ser de difícil travessia. Sinto-me abençoada e fortalecida a cada amanhecer e a cada anoitecer! Todas as graças são para Ti!

Agradeço à minha família, em especial ao meu pai Welton e minha mãe Noeme, que sempre acreditaram em mim e nos meus sonhos. Aos meus irmãos e irmãs queridos(as), Wérica Janaina, Wesley Hydder, Wesleyanne e Welder, que sempre me deram apoio, amor e carinho. Ao meu lindo sobrinho, David, que chegou de surpresa e me encheu de felicidade. Cada foto que recebo sua, renova minhas energias! Aos meus avós, tios e tias, primos e primas, meu muito obrigada! Sei que ficam na torcida, esperando e desejando sempre o melhor de mim e para mim.

Ao querido Guilherme, que esteve presente nos últimos 3 anos de minha vida, dando todo o suporte, apoio, amor e carinho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas, ao Laboratório de Microscopia e a todo o grupo em especial aos meus amigos e colegas de laboratório, Márcia Cristina, Dra. Natália Lemos, Marina Arantes, Ingrid Gracielle, Ana Luisa Govêa, Nábyla Paixão, Bárbara Yasmin, Diogo Loiola, Dra. Thatiane Sampaio, Dra. Bruna Guido, que sempre estiveram disponíveis para ajudar e que me fizeram sentir parte da “Família Microscopia”.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa (Marcelinho) por todo apoio, colaboração, respeito, dedicação e paciência (principalmente! rsrs).

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, Dr. Wagner Fontes e aos técnicos, Jaques Miranda e Nuno Manuel pelo apoio e colaboração.

Agradeço também aos laboratórios de Virologia, Enzimologia, Microbiologia e Nanotecnologia pelo apoio e colaboração.

Aqui escrevo um parágrafo dedicado a aluna de Iniciação Científica, Natália Viana. Sempre acreditei que Deus coloca as pessoas certas e no momento certo em nossas vidas. Você, com certeza, foi enviada de Deus para me auxiliar nos momentos mais difíceis. Obrigada por sua dedicação, seriedade, fé e paciência. Aprendi mais que ensinei. Este trabalho é NOSSO!

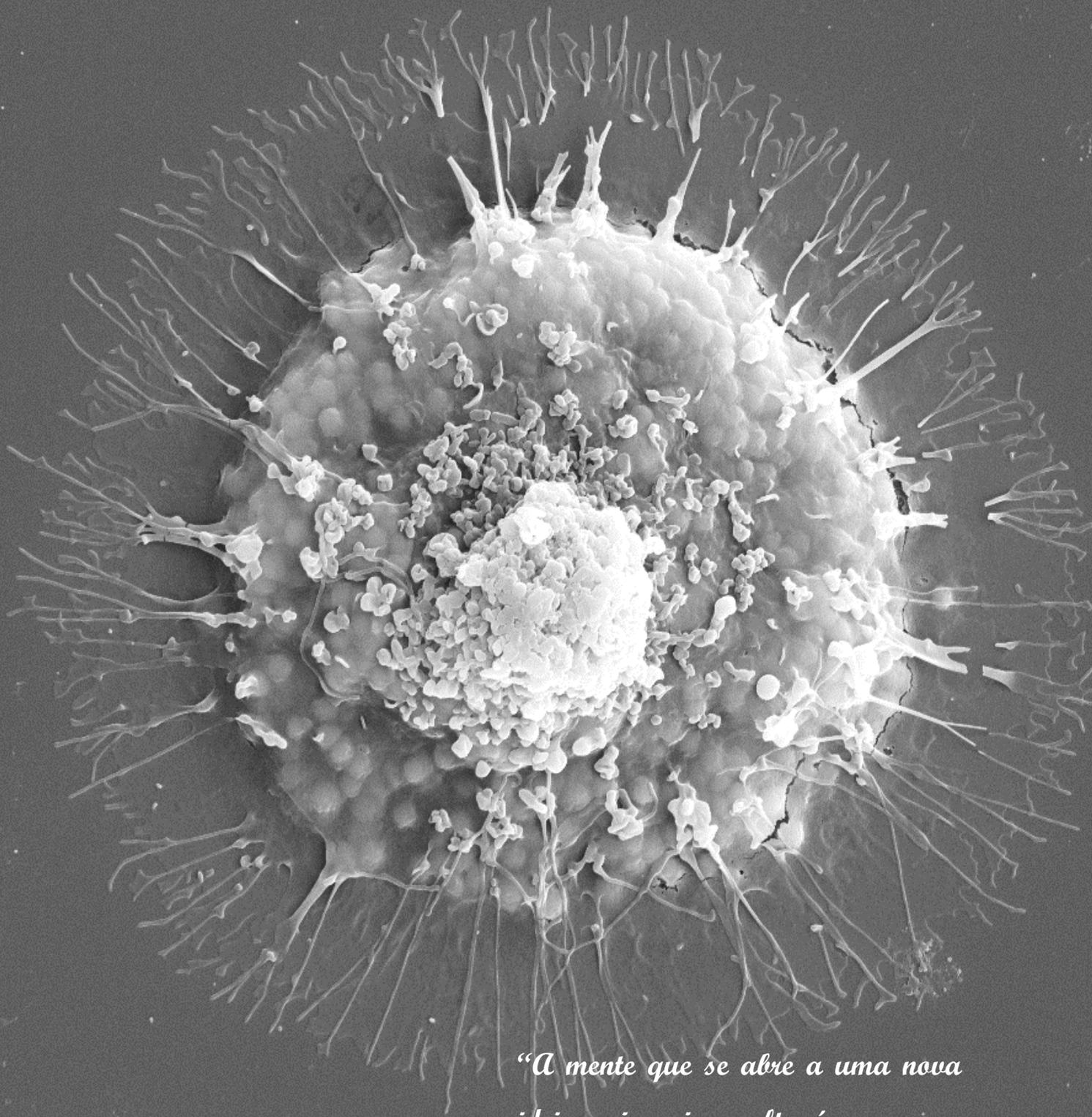
Aos meus amigos do CEF 07, em especial à minha coordenadora Nalva Kássia, ao meu diretor Júlio Louredo e minha querida amiga Mônica Luz que estiveram presentes nestes últimos meses de Mestrado, compartilhando comigo as agonias, sofrimentos, alegrias, experiências, conquistas... com certeza, sem vocês teria sido muito difícil!

Aos meus queridos amigos que a vida, de maneira bem especial, colocou no meu caminho. Em especial, ao meu amigo André Ricardo, que sempre soube, como ninguém, me compreender e encher de ânimo, até mesmo quando a única vontade era de desistir. Obrigada por acreditar em mim e me fazer acreditar! Para mim, você é exemplo!

E agora chegou a vez de agradecer a pessoa que muito admiro e respeito, a pessoa responsável pela realização desse sonho, Prof^ª. Dr^ª. **Sônia Nair Bão**. Como me orgulho em falar que sou sua orientanda. Prof^ª. Sônia, muito obrigada por ter me dado essa oportunidade, mesmo sem me conhecer, e por me incentivar a ir além. Além de ser uma grande orientadora, pra mim, você é exemplo de humanidade. Antes de me enxergar como aluna/pesquisadora, me enxergou como pessoa, ouvindo as minhas lamentações, sendo paciente e acalmando o meu coração. O que você me ensinou não ficará só no artigo, levarei para a vida.

Ao programa pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia e às agências de fomento, CAPES, CNPq, FINEP, FINATEC e FAP-DF pela viabilização do trabalho.

A todos que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.



*“A mente que se abre a uma nova
ideia, jamais voltará ao seu
tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

A Nanociência e a Nanotecnologia possibilitam muitas inovações para a Medicina e para a Ciência Biomédica. Dentre as nanopartículas já existentes, a maghemita associada ao citrato de ródio II (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) tem se mostrado promissora, pois reduz os efeitos adversos do fármaco e mantém a citotoxicidade para células tumorais. Porém, estudos revelam que quando as nanopartículas entram em contato com fluidos biológicos (como por exemplo, o plasma sanguíneo) são recobertas imediatamente por proteínas formando a “proteína corona” que é única para cada nanomaterial. Neste estudo, a adsorção de proteínas mais abundantes de ligação à NPs monodispersas foi estudada *in vitro* após a incubação em soro sanguíneo humano, por uma análise de três etapas: (1) caracterização do fluido magnético (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) antes e depois da incubação com soro, (2) identificação de proteínas e análise da influência da “proteína corona” nas características físicas, bioquímicas e (3) no processo de internalização celular dessas NPs em macrófagos humano. O soro sanguíneo humano alterou as características da NP tornando-a monodispersa, maior e com o potencial zeta menos negativo, indicando a formação da proteína corona. Foram identificadas e caracterizadas 68 proteínas: albumina, IgGs, apolipoproteínas (APOA1), serpinas, complemento (C5), quinases (AKAP 13), haptoglobina, glicoproteínas e transferrinas. São proteínas que em sua maioria promovem opsonização, fagocitose e endocitose em células do sistema imune. O tratamento de magh-Rh₂(H₂cit)₄ sem soro é instável e demonstrou ser mais citotóxicos em células da linhagem U-937 diferenciadas em macrófagos. Já o tratamento de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com soro não precipita mas, também promove citotoxicidade nas células, porém de forma mais controlada. Essa interação mais estratégica se deve às proteínas adsorvidas na superfície nas NPs. Apesar da Magh-Rh₂(H₂cit)₄ ser promissora para tratamentos tumorais é necessário elucidar todos os parâmetros e mecanismos ao qual está submetida, principalmente no que diz respeito a imunotoxicidade haja vista que, entre os vários tipos de células, a interação de NPs com macrófagos é de interesse significativo por causa do papel crucial na iniciação e na modulação de processos inflamatórios em resposta a uma variedade de estímulos, tais como partículas estranhas, bactérias, o stress oxidativo e citocinas.

Palavras chaves: Nanotecnologia. Proteína corona. Macrófagos.

ABSTRACT

Nanoscience and Nanotechnology enable many innovations for Medicine and for Biomedical Science. Among the existing nanoparticles, Magh-Rh₂(H₂cit)₄ has been shown to be promising, since it reduces the side effects of the drug and maintains cytotoxicity for tumor cells. However, studies reveal that when NPs come into contact with biological fluids (such as blood plasma) they are immediately coated by proteins forming the "protein corona" that is unique to each nanomaterial. In this study, the adsorption of the most abundant binding proteins was studied in vitro after incubation in human blood serum of monodisperse NPs by a three-step analysis: (1) characterization of the magnetic fluid (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) before and after incubation with serum, (2) identification of proteins and analysis of the influence of the "protein crown" on physical, biochemical and (3) the cellular internalization process of these NPs in human macrophages. The human blood serum altered the characteristics of NP making it monodisperse, larger and with less negative zeta potential, indicating the formation of the protein crown. We identified and characterized 68 proteins: albumin, IgGs, apolipoproteins (APOA1), serpins, complement (C5), kinases (AKAP 13), haptoglobin, glycoproteins and transferrin. They are proteins that mostly promote opsonization, phagocytosis and endocytosis in cells of the immune system. Treatment of serum-free magh-Rh₂ (H₂cit) 4 is unstable and has been shown to be more cytotoxic. However, the treatment of Magh-Rh₂(H₂cit)₄ with serum does not precipitate but also promotes cytotoxicity in cells, but in a more controlled way. This more strategic interaction is due to the surface adsorbed proteins in the NPs. Although Magh-Rh₂(H₂cit)₄ is promising for tumor treatments, it is necessary to elucidate all the parameters and mechanisms to which it is subjected, especially with regard to immunotoxicity since, among the various types of cells, the interaction of NPs with macrophages is of significant interest because of the crucial role in initiating and modulating inflammatory processes in response to a variety of stimuli, such as foreign particles, bacteria, oxidative stress, and cytokines.

Keywords: Nanotechnology. Protein corona. Macrophages.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVEATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CARBOXILATOS DE RÓDIO: CITRATO DE RÓDIO.....	15
1.2. ASSOCIAÇÃO DE CITRATO DE RÓDIO À NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA (MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄).....	18
1.3. COROA PROTEICA E NANOPARTÍCULAS.....	19
1.4. INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS COM MACRÓFAGOS	24
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	27
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.3. FÁRMACO	29
4.3.1. SÍNTESE DO COMPLEXO DE RÓDIO (II).....	29
4.3.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	30
4.3.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ASSOCIADA AO CITRATO DE RÓDIO	31
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO MAGNÉTICO	32
4.5. OBTENÇÃO DE SORO E SANGUE TOTAL HUMANO	33
4.6. FORMAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA COROA PROTEICA.....	33
4.6.1. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO SANGUÍNEO HUMANO EM MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄	33
4.6.2. LAVAGEM/PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO NP/CP.....	34
4.6.3. DESSORÇÃO DA COROA PROTEICA DA SUPERFÍCIE DAS NPS	34
4.6.4. DIGESTÃO TRÍPTICA DE PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DA SUPERFÍCIE DAS NPS	35
4.6.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS).....	36
4.6.6. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA COROA PROTEICA	37

4.7. INTERAÇÃO DE NPS DE MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄ COM MACRÓFAGOS HUMANO	
38	
4.7.1. LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS E CULTURA CELULAR	38
4.7.2. ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR (MONÓCITO-MACRÓFAGO)	
39	
4.7.3. TRATAMENTO DAS CÉLULAS	39
4.7.4. VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT40	
4.7.5. ANÁLISE DA MORFOLOGIA APÓS O TRATAMENTO COM MAGH-	
RH ₂ (H ₂ CIT) ₄ POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	41
4.8. ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄	42
4.8.1. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	
42	
4.8.2. QUANTIFICAÇÃO POR ICP	42
6. RESULTADOS	43
6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS	43
6.2. ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA EM NANOPARTÍCULA DE MAGH-	
RH ₂ (H ₂ CIT) ₄ APÓS INCUBAÇÃO COM SORO SANGUÍNEO HUMANO	47
6.3. IDENTIFICAÇÃO DA COROA PROTEICA DAS NPs DE MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄ ...	51
6.4. INTERAÇÃO DA NP DE MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄ COM MACRÓFAGOS	55
6.4.1. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM U-937	55
6.4.1. VIABILIDADE CELULAR	58
6.4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM CELULAR U-937 APÓS	
TRATAMENTOS COM MAGH-RH ₂ (H ₂ CIT) ₄	59
6.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE MAGH-	
RH ₂ (H ₂ CIT) ₄	63
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÕES	70
9. PERSPECTIVAS	70
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
11. ANEXO 01	80
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE.....	80
12. APÊNDICE.....	82
01- Resumo expandido apresentado no 26º Congresso Brasileiro de Microscopia – SBMM	
(Armação dos Búzios – Rio de Janeiro/Brasil)	82
02 – Resumo expandido apresentado no XIV Congresso CIASEM 2017 (Varadero-Cuba)	84

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Representação genérica da estrutura do tipo “gaiola” para os carboxilatos de ródio (II)..</i>	16
<i>Figura 2 - Estrutura molecular geral do ácido cítrico (a) e citrato de ródio (II) (b)..</i>	17
<i>Figura 3 - Representação da ligação química do citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita.</i>	19
<i>Figura 4 - Estrutura da Coroa Proteica sobre a Nanopartícula.</i>	21
<i>Figura 7 - Esquema da rota sintética utilizada por Nunes (2010) para a obtenção do citrato de ródio.</i>	29
<i>Figura 8- Figura esquemática da Difração de Raio X.</i>	33
<i>Figura 9 - Células da linhagem U-937..</i>	38
<i>Figura 10 - Análise de estabilidade do composto de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ no decorrer do tempo (7, 15, 30, 45, 90 e 750dias)..</i>	43
<i>Figura 11 - Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita por Microscopia Eletrônica de Transmissão.</i>	44
<i>Figura 12 – Difratograma de raios X do composto Magh-Rh₂(H₂cit)₄..</i>	46
<i>Figura 13 – Caracterização morfológica e composição da nanopartícula de maghemita por Microscopia Eletrônica de Varredura.</i>	46
<i>Figura 14 - Estabilidade de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em diluentes diferentes..</i>	47
<i>Figura 15 - Análise físico-química da amostra de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com e sem adição de soro humano, no decorrer do tempo (0H, 12H e 24H) em diferentes temperatura (25°C e 37°C).</i>	48
<i>Figura 16 - Análise físico/química do composto de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sem soro e com adição de soro humano sem lavar e depois de lavada.</i>	50
<i>Figura 17 - Micrografias de nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por Microscópio Eletrônico de Transmissão.</i>	51
<i>Figura 18 - Gel de acrilamida com os passos de lavagem.</i>	51
<i>Figura 19 - Gel de acrilamida dos controles negativos.</i>	52
<i>Figura 20 - Micrografias da diferenciação celular da linhagem U-937 por Microscópio de luz.</i>	55

<i>Figura 21 - Micrografias Eletrônica de Varredura da linhagem U-937 antes e depois da diferenciação.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22 - Análise da diferenciação celular da linhagem U-937 por citometria de fluxo por fluorescência do marcador CD14.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 23 - Análise por citometria de fluxo do percentual de diferenciação por Forbol 12-miristato 13-acetato da linhagem U-937 de populações de macrófagos CD14+ e monócitos.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 24 - Análise comparativa de estudo da interferência da tripsina nos receptores do CD14.</i>	<i>57</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Forças que contribuem para as interações entre proteínas e Nanomateriais.</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 2 - Reagentes utilizados nos experimentos.</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 3 - Discriminação da condição de funcionalização de nanopartículas para preparação do fluido magnético.</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 4 - Concentração final dos fluidos magnéticos.</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 5 - Discriminação das médias obtidas na análise da amostra de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ incubada com soro sanguíneo humano e diluída em água (controle).</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 6 - Discriminação das médias obtidas na análise do composto de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sem soro e com adição de soro humano sem lavar e depois de lavada.</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 7 - Proteínas da Coroa Proteica de nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄.</i>	<i>53</i>

LISTA DE ABREVEATURAS

- μ l:** Microlitro;
 μ m: Micrometro;
 μ M: Micromolar;
ACN: acetonitrila;
ATCC: American Type Culture Collection;
AuNP: Nanopartícula de ouro;
BSA: Albumina Sérica Bovina;
Cit: Citrato;
CO₂: gás carbônico;
CP: Coroa proteica;
CTRL: Controle;
DH - Diâmetro Hidrodinâmico;
FDR - False discovery rate, taxa de descoberta de falsos positivo
HOAc: ácido acético;
ICP-OES: Espectrofotometria de Emissão Óptica de Plasma Acoplado Indutivamente;
M: Molar;
Magh-Rh₂(H₂cit)₄: nanopartículas de maghemita associadas a citrato de ródio;
MET: Microscópio Eletrônico de Transmissão;
MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura;
mm: Milímetro;
mM: Milimolar;
MTT: Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio;
mV: Milivolts;
NH₄HCO₃: bicarbonato;
nm: Nanômetros;
NPs: Nanopartículas;
PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis;
PBS: Solução tamponada de fosfato;
 γ -Fe₂O₃: Maghemita
DLS: Dynamic light scattering;
DMSO: Dimetilsulfóxido;
DRX: Difração de raios X;
DTT: ditioneitol
EDS/EDX: Espectroscopia de raios X por dispersão em energia;
EDTA: Ácido etilenodiamino;
EUA: Estados Unidos das Américas;
Fe₃O₄: Magnetita;
FeCl₂: cloreto de ferro II;
FeCl₃: cloreto de ferro III;
HNO₃: ácido nítrico;
PDI: Índice de Polidispersão;
pH: Potencial de Hidrogênio;
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
P ζ : Potencial Zeta;
r.p.m.: Rotações por minuto;
R_{adc}: razão molar entre a quantidade de adsorvato adicionada e a quantidade de maghemita nos fluidos preparados;
Rh₂(H₂cit)₄: Citrato de ródio (II);
Rh₂(tfa)₄: trifluoroacetado de ródio (II);
RPMI: Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute;
SDS-PAGE: dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida
SFB: Soro Fetal Bovino;
SPIOs: Partículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas;
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
TFA: ácido trifluoroacético;
VDW - Van der Waals

1. INTRODUÇÃO

Várias tecnologias são empregadas para melhorar a farmacocinética de medicamentos e, dessa forma, contribuir para a qualidade de vida das pessoas que necessitam fazer uso contínuo dos mesmos. Inseridas no conjunto de inovações e possibilidades, a Nanociência e Nanotecnologia são ferramentas importantes para esse segmento e uma das perspectivas é o uso de nanopartículas (NPs), tecnologia que atualmente está sendo incorporada e utilizada para resolver problemas técnicos da ciência moderna, principalmente no campo da Medicina e da Ciências Biomédicas (FONTANIVE *et al.*, 2014; FOROOZANDEH & AZIZ, 2015).

As nanopartículas magnéticas, compostas por diferentes tipos de materiais, são promissoras para aplicação biomédica. Elas possibilitam a incorporação de fármacos que poderão ser direcionados ao seu local de ação, através de um campo magnético. Devido às suas características físicas e químicas, essas nanopartículas contribuem com a redução da dose do fármaco, direcionando este para um local de ação, reduzindo seu acúmulo em outros órgãos e tecidos, reduzindo assim os efeitos colaterais, diminuindo o risco de toxicidade e o tempo de circulação no organismo (BARRÁN-BERDÓN *et al.*, 2013; FONTANIVE *et al.*, 2014). Estudos revelaram que o composto citrato de ródio $[Rh_2(H_2cit)_4]$ ao ser combinado com nanopartículas de maghemita reduziu a toxicidade característica do mesmo (*in vivo* e *in vitro*) além de ser citotóxico para células tumorais diminuindo a área do tumor (CARNEIRO, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2011; 2013; 2015; CHAVES, 2013; PEIXOTO, 2012; PEIXOTO *et al.*, 2014; CHAVES *et al.*, 2015).

Outro ponto importante e que tem sido bastante estudado é o fato de que quando as NPs entram em contato com fluidos biológicos (por exemplo, plasma sanguíneo humano), sofrem modificações da superfície devido à dinâmica e interações físico-químicas com componentes biológicos tais como, peptídeos, glicolipídios e especialmente proteínas, que adsorvem à superfície das NPs conduzindo à formação de uma cobertura denominada “Coroa Proteica”.

Essas proteínas podem influenciar as interações biológicas das NPs, eventualmente determinando o seu destino no interior do corpo (PADMAVATHY & VIJAYARAGHAVAN, 2008; LIU, *et al.*, 2013; BARRÁN-BERDÓN *et al.*, 2013; SCHAFFER *et al.*, 2013).

Neste estudo, a adsorção das proteínas mais abundantes de ligação foi realizada *in vitro* após a incubação de NPs monodispersas em soro humano, por uma análise de três etapas: caracterização do fluido magnético (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) antes e depois da incubação com soro sanguíneo humano, identificação de proteínas e análise da influência da “coroa proteica” nas características físicas, bioquímicas e no processo de internalização celular dessas NPs em macrófagos humano.

1.1. CARBOXILATOS DE RÓDIO: CITRATO DE RÓDIO

Após a descoberta acidental da cisplatina como um agente quimioterapêutico por Rosenberg e colaboradores, em 1965, vários outros compostos metálicos vêm sendo estudados e têm demonstrado resultados promissores (ABRAMS & MURRER, 1993; MUHAMMAD & GUO, 2014). Os agentes quimioterápicos a base de metais têm cinética e mecanismo de ação diferente de drogas orgânicas convencionais (GUO & SADLER, 1999), o que despertou interesse na comunidade científica em elucidar os mecanismos biológicos e os efeitos desses agentes químicos.

Outros compostos metálicos que apresentaram atividade antitumoral considerável são os do grupo dos carboxilatos de ródio (II), [Rh₂(O₂CR)₄], que se tornaram mais uma opção com um alto potencial (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Estes compostos possuem uma estrutura básica “tipo gaiola” formada pela ligação em ponte de quatro grupos carboxilatos na região equatorial à ligação Rh²⁺ - Rh²⁺ (**figura 1**).

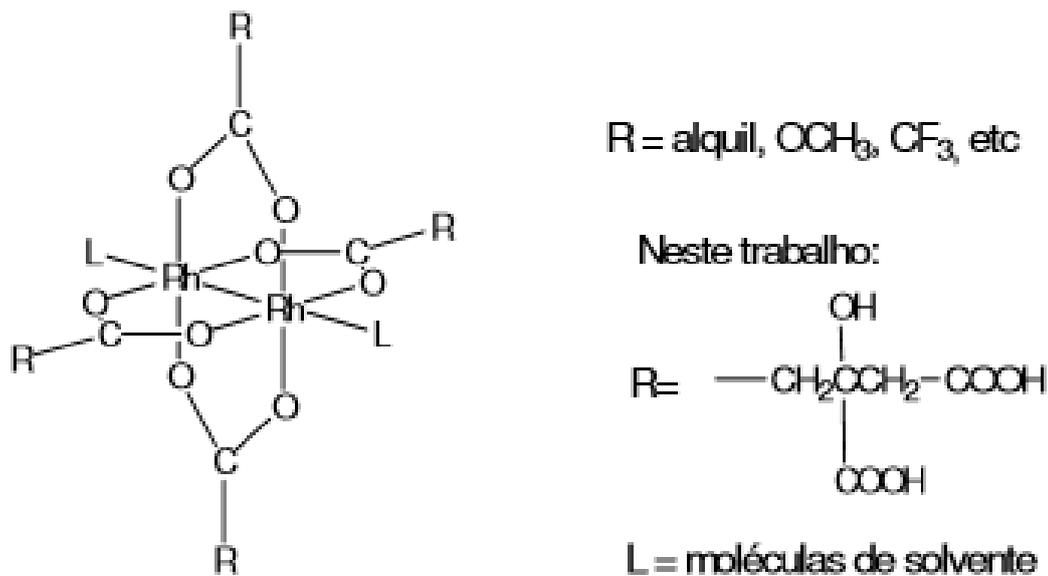


Figura 1 - Representação genérica da estrutura do tipo “gaiola” para os carboxilatos de ródio (II). A estrutura é formada por ânions carboxilatos nas posições equatoriais à ligação Rh-Rh. A posição axial normalmente pode ser ocupada por moléculas de solventes. (NUNES, 2010).

Os carboxilatos de ródio da série acetato, propionato, butirato e pentanoato foram os primeiros a terem os efeitos biológicos avaliados (ERCK, *et al.*, 1974; WEIDMANN, KOMOR & BARTON, 2013). Eles mostraram uma ação considerável na sua atividade antitumoral contra células tumorais de ascite de Ehrlich em camundongos, sendo o complexo de butirato o mais ativo (BEAR, *et al.*, 1974). Foi observado que a atividade antitumoral e a toxicidade aumentam com o caráter hidrofóbico dos compostos (HOWARD; *et al.*, 1977).

Após testes, percebeu-se que os carboxilatos de ródio possuem a característica de alta toxicidade, porém, baixa solubilidade. A única exceção foi o citrato de ródio (II) (Rh₂(H₂cit)₄). Este possui elevada solubilidade, necessitando assim de elevadas doses sistêmicas do fármaco para alcançar as concentrações eficazes em locais do tumor (DE SOUZA, 1996; CHAVES, 2013).

O citrato de ródio, é um complexo dinuclear formado pela ligação em ponte de quatro íons citrato a uma unidade dimetalica Rh²⁺ - Rh²⁺. Este complexo possui uma cadeia fechada composta por duas moléculas de ródio ligadas a água na sua posição axial e por quatro grupos

radicais constituídos por citrato. Os grupos citrato são constituídos, por sua vez, por três carboxilas que podem estar tanto nas posições alfa (α) como beta (β), como podem ser observados na figura 2 (CARNEIRO, 2011; CARNEIRO, *et al.*, 2013).

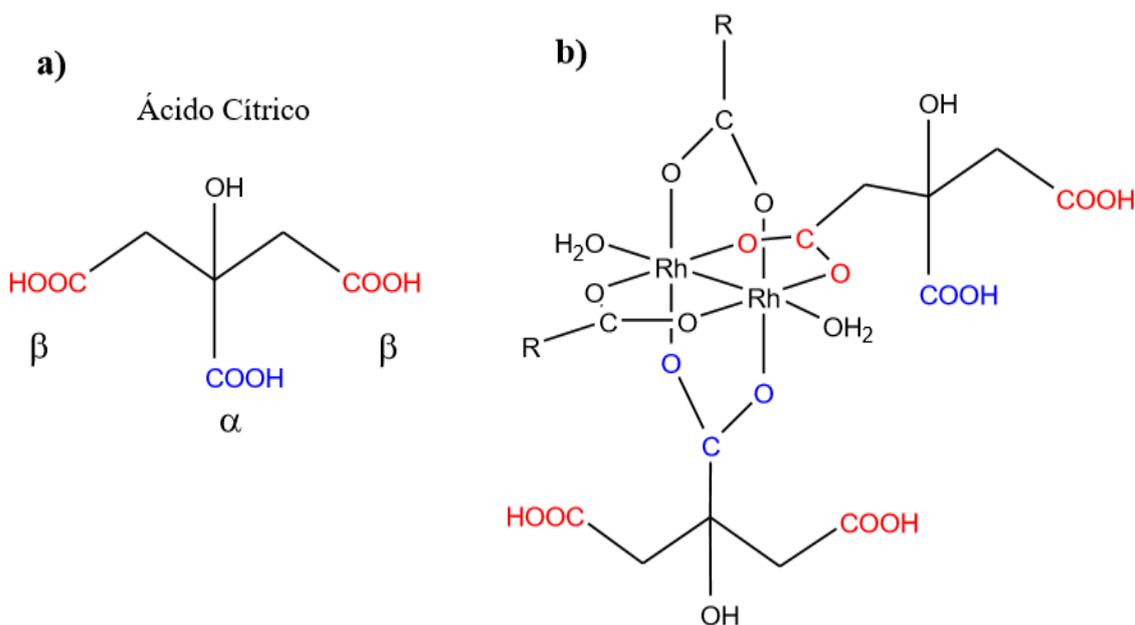


Figura 2 - Estrutura molecular geral do ácido cítrico (a) e citrato de ródio (II) (b). Os grupos carboxílicos do ácido cítrico são observados nas posições α e β . Na representação (b) pode ser visualizado que a coordenação com o centro dimetálico de ródio pode ocorrer com ambos os grupos. (CARNEIRO, 2011).

Apesar de ter sido comprovadas sua capacidade antitumoral, citotóxica e citostática em células tumorais, o citrato de ródio também apresentou-se tóxico em células normais porém, em menor grau em relação aos outros carboxilatos de ródio, o que indica que $\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ é um agente promissor para quimioterapia (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Todavia, é necessário que mais pesquisas sejam realizadas a fim de desenvolver metodologias como por exemplo funcionalização da superfície, e elucidar os mecanismos aos quais envolvam o ambiente biológico.

1.2. ASSOCIAÇÃO DE CITRATO DE RÓDIO À NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA (MAGH-RH₂(H₂CIT)₄)

As nanopartículas de óxidos magnéticos são compostas normalmente por magnetita (Fe₃O₄), maghemita (Fe₂O₃), ferrita de cobalto (CoFe₂O₄), ferrita de níquel (NiFe₂O₄) e demais óxidos (YANG *et al.*, 2006).

A primeira vantagem do uso das NPs de óxidos magnéticos para aplicações biomédicas está no fato de se conseguir um controle do tamanho destas estruturas desde poucos nanômetros até centenas de nanômetros, levando a possibilidade de síntese de NPs de dimensões menores que as células ou em tamanhos comparáveis à vírus, proteínas ou genes. Isso significa que as nanopartículas são capazes de interagir com a entidade biológica de interesse (GUPTA & GUPTA, 2005; FONTANIVE, *et al.*, 2015).

A segunda vantagem é que essas partículas são magnéticas, ou seja, são capazes de responder à um gradiente externo de campo magnético. Como os tecidos humanos apresentam penetrabilidade ao campo magnético, estas NPs podem ser transportadas para tecidos de interesse, como tumores, por exemplo e apresentar ação específica. Na maioria dos casos, as partículas superparamagnéticas (geralmente γ -Fe₂O₃ e Fe₃O₄), não retém qualquer magnetização remanescente, após remoção do campo magnético, sendo assim de interesse para as aplicações *in vivo* (BERRY & CURTIS, 2003).

As NPs magnéticas também podem conter um grupo de átomos radionuclídeos (átomos com núcleos instáveis, que emitem radiação, podendo ligar-se quimicamente a outras moléculas que apresentam uma afinidade particular para determinado processo fisiológicos destinados a uma região alvo do corpo, como por exemplo, um tumor (PANKHURST *et al.*, 2003).

O citrato de ródio (II) apresenta oito ácidos carboxílicos livres (R-COOH) em sua estrutura, sendo dois para cada um dos seus quatros radicais (**Figura 3**) (CARNEIRO, 2011; CARNEIRO, *et al.*, 2013;). Estes grupos funcionais (R-COOH) podem estabelecer interações

físicas e químicas quando usados em reações com determinadas moléculas ou superfícies iônicas. Devido à similaridade entre os grupos funcionais de (COOH e –OH) e os de moléculas bioativas (presentes em ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, etc.), estes têm sido utilizados para funcionalizar SPIOs (Partículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas) (GUPTA e GUPTA, 2005).

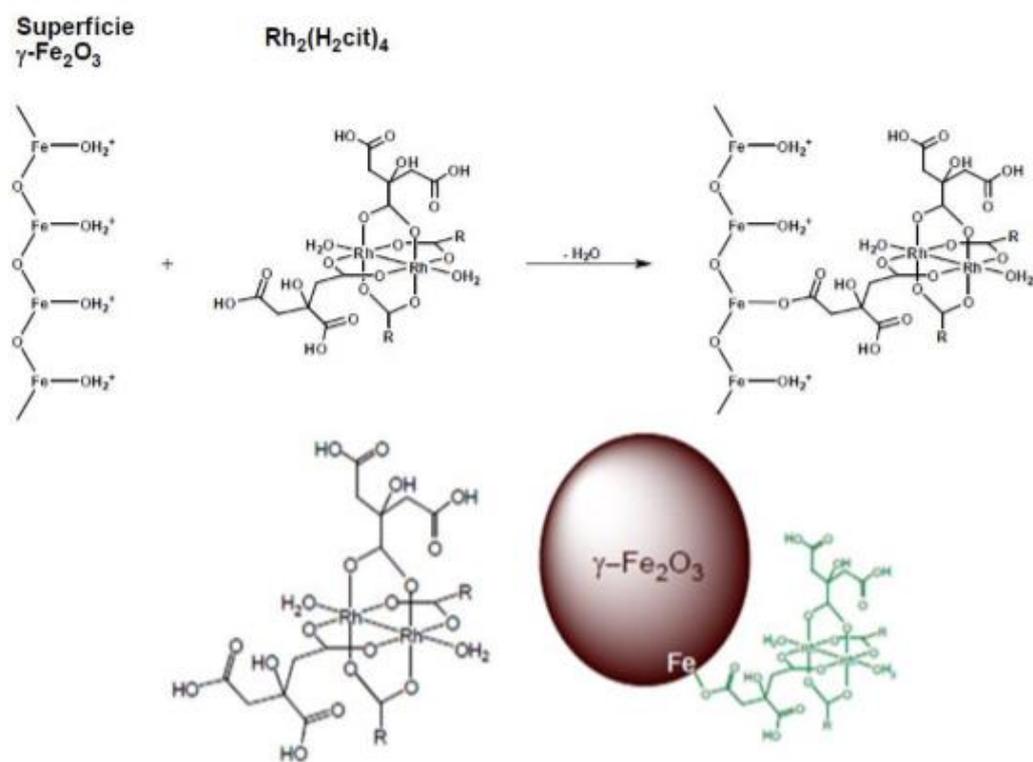


Figura 3 - Representação da ligação química do citrato de ródio (II) com nanopartículas de maghemita. (Adaptado de CARNEIRO, 2011; PEIXOTO, 2012).

Desta forma, o grupo citrato possui capacidade de funcionalizar SPIOs para promover a estabilidade de suspensões coloidais biocompatíveis e estáveis, tornando-as adequadas para aplicações em sistemas de liberação de drogas.

1.3. COROA PROTEICA E NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas (NPs) são cada vez mais importantes para aplicações biológicas principalmente no que diz respeito à entrega de drogas, sendo utilizadas para diversas terapias,

como por exemplo, câncer (HIRSCH *et al.*, 2003; KOHANE, 2007; PRIDGEN, LANGER & FAROKHZAD, 2007; DE, GHOSH & ROTELLO, 2008; GILJOHANN *et al.*, 2010; DREADEN *et al.*, 2011; LOHSE & MURPHY, 2012). De fato, NPs são uma ferramenta que tem despertado interesse na comunidade científica durante décadas. Porém, apesar de ser uma tecnologia promissora, deve-se ter alguns cuidados e precauções principalmente, no que diz respeito às aplicações biológicas.

Estudos revelam que as NPs ao terem contato direto com fluídos biológicos (sangue, por exemplo) interagem com várias biomoléculas, em especial com elevadas concentrações de proteínas (60-80 g/L) que as recobrem imediatamente formando uma coroa proteica que altera significativamente a sua identidade, produzindo a sua chamada “identidade biológica” e isso afeta criticamente respostas fisiológicas e terapêuticas e, por não se ter muito conhecimento sobre esse aspecto, a Proteína Corona (PC) tem emergido como um fator preponderante na segurança, na biodistribuição final de NP e na eficácia de aplicações e terapias à base de nanodispositivos sendo portanto, uma ferramenta ainda limitada (LÜCK *et al.*, 1998; MONOPOLI *et al.*, 2012; SCHAFFER *et al.*, 2013; FOROOZANDEH & AZIZ, 2015; CARACCILO, FAROKHZAD & MAHMOUDI, 2016; O’BRIEN & SHEA, 2016).

Estruturalmente, a CP pode ser dividida em dois diferentes componentes: a coroa dura (a fração de proteínas que está ligada à superfície da NP) e a coroa mole (a fração de proteínas que faz troca com as proteínas circundantes de acordo com a sua abundância no sangue e as suas afinidades de ligação, as quais podem levar a mudanças dinâmicas na composição da proteína corona) (CEDERVALL *et al.*, 2007b; CASALS *et al.*, 2011; MILANI *et al.*, 2012; SCHAFFER *et al.*, 2013). Logo abaixo segue uma representação esquemática da estrutura da coroa proteica (**Figura 4**) (YANG *et al.*, 2013).

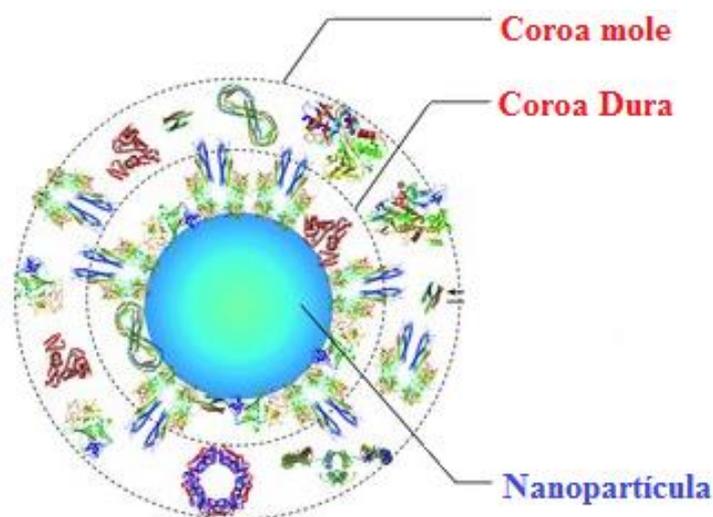


Figura 4 - Estrutura da Coroa Proteica sobre a Nanopartícula.
Modificado. (YANG *et al.*, 2013).

Muitas interações podem contribuir para adsorção de proteínas na NP, tais como forças de dispersão, ligações de Hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e interações de empilhamento π - π . As características destas interações foram resumidas em forma de tabela por Yang *et al.* (2013) e está logo abaixo (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Forças que contribuem para as interações entre proteínas e Nanomateriais.

Interações	Força	Quantidade	Contribuição líquida	Faixa [nm] *	Especificidade	Fatores principais
Forças de dispersão	Fraco	Um grande número	Grande	0-10	Não	Complementaridade de interface
Ligações de H	Moderado	Muitas	Pequena	<0	Parcial	Doador de hidrogênio/aceitador na interface
Forças de Coulomb	Moderado	Muitas	Moderada	0-10	Não	Estado de carga, força de íons
Interação hidrofóbica	Forte	Algumas	Grande	0~10	Parcial	Superfície hidrofóbica
Empilhamento π - π	Forte	Um pouco	Grande	0~5	Sim	Orientação do anel aromático
Ponte salina	Forte	Um pouco	Moderada	<1	Sim	Reconhecimento múltiplo

* Indica contato direto de átomo (baseado no raio de vdw). Fonte: YANG *et al.*, 2013

Embora os fluidos biológicos contenham uma grande variedade de proteínas, a composição da CP é única para cada nanomaterial e é influenciada por vários parâmetros tais como: as propriedades físico-químicas da nanopartícula e características do ambiente. O tempo para ocorrer a adsorção de uma mistura complexa de proteínas do plasma para uma superfície de NPs pode demorar desde alguns minutos até várias horas (BARRÁN-BERDÓN *et al.*, 2013; FOROOZANDEH & AZIZ, 2015; TREUEL, 2015).

As propriedades físico-químicas ou identidade sintética da NP (tamanho, forma, carga, pH, dentre outros), são determinantes na formação da coroa de nanopartículas de ouro (LUNDQVIST *et al.*, 2008; NEL *et al.*, 2009; SCHAFFER *et al.*, 2013).

O complexo NP-CP, é dinâmico por natureza e depende também de fatores como ambiente, temperatura, concentração e o tipo de plasma/soro, tempo de incubação, dentre outros fatores. No estudo *in vitro* é mais fácil controlar esses fatores, mas em um ambiente dinâmico, por exemplo, dentro do organismo vivo (*in vivo*), a medida que as NPs migrarem através do corpo, elas vão encontrar diferentes meios fisiológicos (BRAUN *et al.*, 2016, CARACCILO, FAROKHZAD & MAHMOUDI, 2016).

Na maioria dos casos, proteínas com alta abundância no plasma são adsorvidas na superfície e, ao longo do tempo, são substituídas por proteínas de menor concentração, mas com maior afinidade (RAHMAN *et al.*, 2013). Estas mudanças na composição da proteína corona resultante da dessorção/adsorção são conhecidas como o “efeito Vroman”. Este efeito leva em conta que as identidades das proteínas adsorvidas podem mudar ao longo do tempo, mesmo que a quantidade total de proteína adsorvida permaneça aproximadamente constante (VROMAN, *et al.*, 1980). Durante a formação inicial da proteína corona, as proteínas com as maiores taxas de associação adsorvem a um nanomaterial. Se essas proteínas tiverem tempos de permanência curtos, elas serão substituídas por outras proteínas que podem ter taxas de associação mais lentas, mas tempos de permanência mais longos. Durante a adsorção de

proteínas plasmáticas, o efeito Vroman pode ser dividido em estágios “iniciais” e “tardios”. O estágio inicial envolve a rápida adsorção de albumina, IgG e fibrinogênio, que são substituídos no segundo passo por apolipoproteínas e fatores de coagulação. O estágio inicial do efeito Vroman não é observado para todos os nanomateriais. O estágio final do efeito Vroman ocorre quando proteínas com afinidades moderadas são substituídas por aquelas que possuem afinidades muito altas. (GÖPPERT & MÜLLER, 2005).

Compreender a formação da CP e suas consequências biológicas é fundamental para o campo da nanomedicina uma vez que as características das proteínas e das NPs tendem a mudar consideravelmente mediante as interações (FLEISCHER & PAYNE, 2014). Em particular, as proteínas tendem a sofrer mudanças conformacionais, que pode ser reversível ou irreversível e tais alterações na forma e na função poderiam potencialmente produzir efeitos adversos ou não. Sendo que geralmente, as propriedades das NPs, tais como, a forma, o tamanho e a carga mudam. Geralmente as NPs tornam-se maiores. A camada de proteínas tem impacto sobre a toxicidade das NPs, reconhecimento imunológico, capacidade de segmentação, biodistribuição, absorção celular e liberação do fármaco. É difícil estabelecer regras gerais sobre o comportamento das NPs no plasma, ainda mais com a vasta gama das mesmas (WOLFRAM *et al.*, 2014).

Apesar de tantos estudos realizados, até o momento, ainda não foi decifrado os mecanismos que regulam a interação entre NPs, sua coroa proteica e sistemas biológicos. Este conhecimento é necessário para prever possíveis reações imunológicas e toxicologicamente relevantes para elucidar os mecanismos que determinam a captação e o acúmulo de NP em órgãos-alvo. Obter uma melhor compreensão da interface nano-plasma poderia ajudar na superação de desafios em nanomedicina e oferecer oportunidades para explorar esses tipos de interações (SCHAFFER *et al.*, 2013; WOLFRAM *et al.*, 2014; CARACCILO, FAROKHZAD & MAHMOUDI, 2016; ESCAMILLA-RIVERA *et al.*, 2016).

1.4.INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS COM MACRÓFAGOS

O sistema mononuclear fagocitário inclui as células circulantes denominadas monócitos e células residentes teciduais denominados macrófagos. Os macrófagos teciduais são produzidos pela diferenciação de monócitos recrutados do sangue. Os monócitos circulantes são de vida curta e sofrem morte celular apoptótica na ausência de diferenciação (RICARDO; VAN GOOR & EDDY, 2008).

Os macrófagos, que são amplamente distribuídos nos órgãos e tecidos conectivo, tem papel central na imunidade inata e adaptativa. Sua função primária é ingerir e destruir partículas, sejam elas restos celulares, partículas inertes ou microrganismos e se livrar dos tecidos danificados (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2015).

O corpo humano reconhece as NPs como entidades estranhas, portanto, elas são rapidamente removidas da circulação sanguínea (BREUNIG, BAUER & GÖPFERICH, 2008). Células específicas do sistema imune como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas têm sido estudados por vários pesquisadores, e é bem conhecido que macrófagos estão predominantemente envolvidos nesses mecanismos (CHELLAT, et al., 2005).

A endocitose é o principal mecanismo responsável pela internalização de nanomateriais em células eucarióticas (ZHAO *et al.*, 2011). Vários aspectos são importantes para a internalização de um nanomaterial, como o tipo de interação que ele estabelece com a membrana plasmática, sua forma e composição, além de seu tamanho e revestimento (ZHAO *et al.*, 2011).

O conhecimento da endocitose e os destinos intracelulares de nanopartículas são indispensáveis para projetar aplicações terapêuticas, além de ser útil na avaliação citotóxica desses materiais. O estudo do tráfego celular tem grande importância no desenvolvimento de nanocarreadores, pois quando definido o alvo intracelular, é possível aprimorar a aplicação terapêutica e conseqüentemente, estabelecer tratamentos médicos mais eficazes.

Os macrófagos desempenham um papel crucial na iniciação e na modulação de processos inflamatórios em resposta a uma variedade de estímulos, tais como partículas estranhas, bactérias, stress oxidativo e citocinas. Embora a associação de NP com macrófagos possa ser desejável para aplicações onde o alvo de tecido inflamatório patológico é necessário (BULTE & KRAITCHMAN, 2004), para muitas outras aplicações de nanomedicina não é. Portanto, a indução de uma resposta pró-inflamatória por macrófagos, a saber, a produção de citocinas, pode ser classificada como uma reação indesejada para nanomedicina, uma vez que sua superprodução constante está associada direta ou indiretamente à patogênese de várias doenças autoimunes e seus níveis são comumente elevados em pacientes com câncer, doenças cardiovasculares e inflamatórias (HANSSON, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Após a administração de uma NP no organismo, ela interage imediatamente com o sangue e são cobertas por proteínas do soro, formando a proteína corona. Apesar de estudos terem demonstrado resultados promissores com $\text{Mg}_h\text{-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (CARNEIRO *et al.* 2011; 2013, 2015; CHAVES, 2013; 2017; PEIXOTO *et al.*, 2014; CHAVES *et al.*, 2015; 2017), ainda permanecem desconhecidas as propriedades e composição da proteína corona dessas nanopartículas. Esses critérios são imprescindíveis para direcionar a compreensão tanto do risco quanto da avaliação do potencial farmacológico na engenharia dessas NPs. Diante disso, este trabalho propõe um estudo sobre as proteínas humanas capazes de serem adsorvidas às nanopartículas de maghemita associadas a citrato de ródio ($\text{Mg}_h\text{-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) e a interação desse complexo com células do sistema imunológico (macrófago humano).

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

- Identificar e caracterizar as principais proteínas do soro sanguíneo humano, capazes de adsorver às nanopartículas Magh-Rh₂(H₂cit)₄ e estudar a interação desse complexo (NP/PC) com macrófago humano.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dosar o teor de ferro nas nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por ICP-OES (Espectrofotometria de Emissão Óptica de Plasma Acoplado Indutivamente);
- Avaliar as alterações de carga, diâmetro e pH antes e após a formação da “coroa proteica” em nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄;
- Verificar o tamanho das nanopartículas sem coroa proteica por MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão), MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) e DRX (Difração de Raio X);
- Identificar as principais proteínas do soro sanguíneo humano capazes de se adsorver a superfície de nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por espectrometria de massa;
- Diferenciar a linhagem monócítica humana, U-937, em macrófagos e descrever as alterações morfológicas após a diferenciação celular e depois do tratamento com nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com e sem coroa proteica, por microscópio de luz AxioVision 100, MET, MEV e citometria de fluxo;
- Avaliar a viabilidade celular dos macrófagos com diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações da nanopartícula com “coroa proteica” e sem “coroa proteica”;

- Quantificar, avaliar e visualizar alterações na internalização celular em macrófagos antes e após a formação da “coroa proteica” em nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ através de MET e ICP;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados para a realização dessa pesquisa seguem listados abaixo na tabela 2.

Tabela 2 - Reagentes utilizados nos experimentos.

Materiais	Fabricante
Trifluoroacetato dimérico de Ródio (II); Azul de tripan; DMSO; solução antibiótica (penicilina e estreptomicina); 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA); bicarbonato (PA); Iodocetamida (IAA); Empore Octadecyl C18 para Stage Tips; Ácido nítrico;	Sigma-Aldrich, EUA.
RPMI; Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA;	GIBCO, EUA.
Paraformaldeído 37%;	Vetec, Brasil.
MTT;	Molecular Probes, EUA.
CD14 monoclonal antibody (TUK4), APC-alexa fluor 750 0.5m; kit Qubit® 2.0 Fluorometer; Guanidina;	Invitrogen/Life/Thermo Scientific, EUA.
Etanol; acetato de etila; metanol; éter de petróleo;	Dinâmica, Brasil.
Tampão fosfato salino (PBS);	Laborclin, Brasil.
DTT	GE Healthacare Life Science, EUA.
Acetonitrila	Fluka
Matriz HCCA	Bruker, Alemanha.
Resina Dr Spurr; glutaraldeído; acetato de uranila, tetróxido de ósmio; ferricianeto de potássio.	Electron Microscopy, EUA.

Para caracterização das nanopartículas foram utilizados os equipamentos, Zetasizer Nano ZS (Malvern), Difrator de Raio X (DRX), Microscópio Eletrônico de Transmissão - MET (JEOL, JEM-2100, equipado com EDS, Thermo scientific (LabMic) e JEOL 1011, 100 kV), Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV (JGM 7001F, Tóquio, Japão) e espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente - ICP-OES (Perkin Elmer modelo Optima 8000). Para quantificação das proteínas, foi utilizado o kit Qubit® 2.0 Fluorometer da Invitrogen, EUA. A identificação das proteínas foi realizada sob a supervisão do professor Dr.

Marcelo Valle de Sousa no laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – UnB. O equipamento utilizado foi o espectrômetro de massa híbrido LTQ Velos Pro Orbitrap Elite (Thermo Scientific). Para análise da morfologia celular foi utilizado o microscópio de luz Axiovert e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100 – ambos da Zeiss, Alemanha. E para análise ultraestrutural intracelular e morfologia, foram utilizados MET e MEV. Para quantificação de NPs intracelular foi utilizado o equipamento ICP-OES. As leituras de absorbâncias e fluorescência foi realizada utilizando o equipamento Spectramas M5 e os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi FACS Calibur, BD Biosciences, Inc., San Jose, CA e a análise dos dados foi realizada no programa Flow Jo v.5.2.7, Tree Star, Inc. As análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism %, GraphPad Software, Inc.

4.2.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos que foram realizados no projeto com os respectivos equipamentos utilizados, estão organizados no diagrama esquemático da Figura 5 e detalhado nos tópicos seguintes.

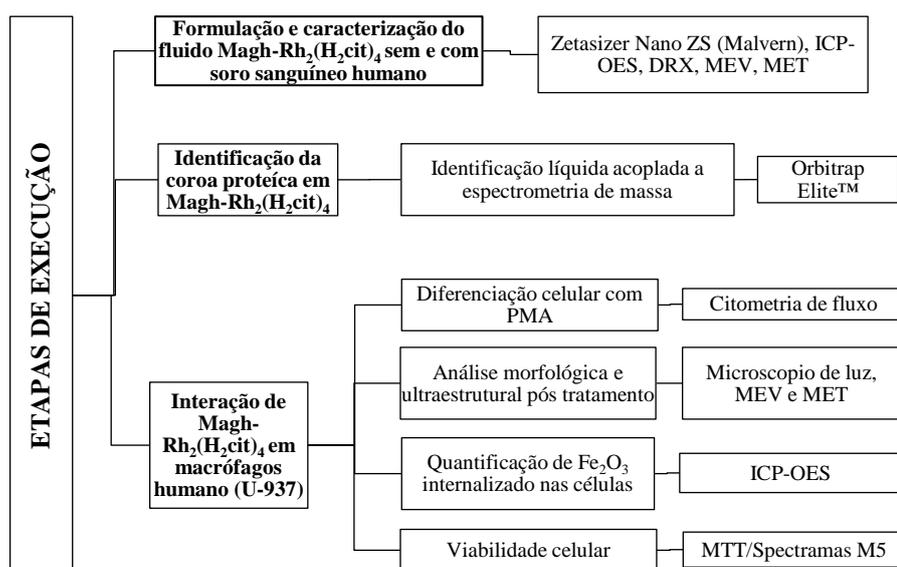


Figura 5 - Diagrama esquemático do delineamento experimental do projeto.

4.3. FÁRMACO

Foram utilizadas amostras de citrato de ródio associado à nanopartículas de maghemita, nas concentrações de 50 μM , 100 μM , 200 μM e 300 μM , obtidas a partir da diluição da amostra estoque magh-Rh₂(H₂cit)₄ sintetizada sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa da Faculdade de Ceilândia, UnB, Brasília-DF.

4.3.1. SÍNTESE DO COMPLEXO DE RÓDIO (II)

A rota de síntese proposta já havia sido experimentada em outros trabalhos (NUNES, 2010; NUNES *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2011) porém, houve algumas adaptações no protocolo. A primeira etapa da síntese partiu do trifluoroacetato de ródio (II), [Rh₂(tfa)₄] disponível na Sigma Aldrich. Isso possibilitou o avanço de duas etapas descritas nos trabalhos anteriormente citados e demonstrado no esquema abaixo (**Figura 7**).

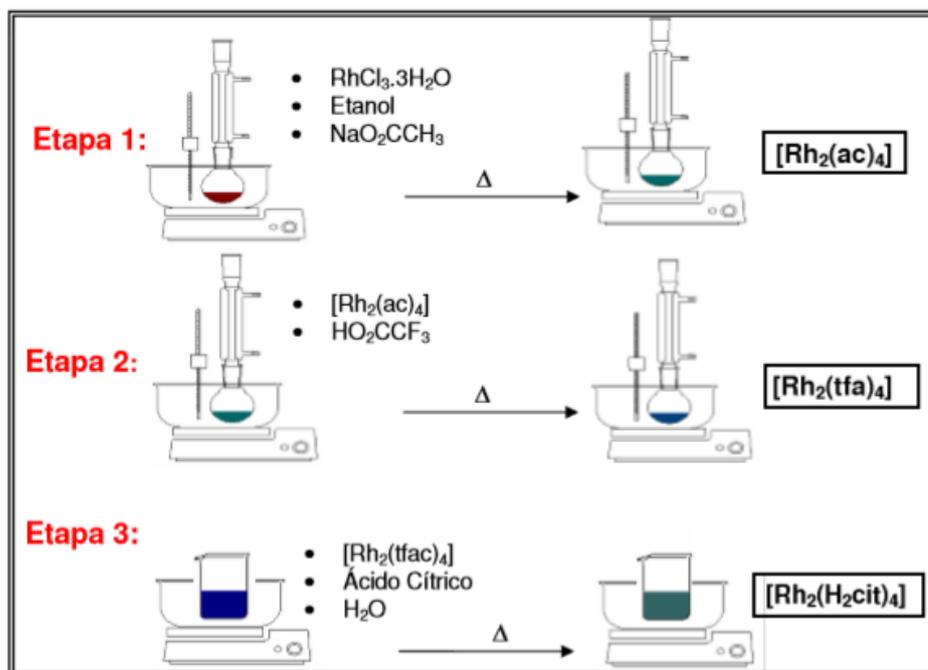


Figura 5 - Esquema da rota sintética utilizada por Nunes (2010) para a obtenção do citrato de ródio. Na primeira etapa a estrutura tipo “gaiola” é obtida contendo íons acetato como ligantes equatoriais sendo obtido o composto acetato de ródio(II), [Rh₂(ac)₄] (REMPEL, 1972). Na segunda etapa os íons acetato são trocados por íons trifluoroacetato para formar o trifluoroacetato de ródio(II), [Rh₂(tfa)₄], preservando a estrutura (BEAR; KITCHENS; WILLCOTT, 1971). Por último, os íons trifluoroacetatos são trocados por íons citrato para formação do citrato de ródio(II).

Para a síntese do citrato de ródio, utilizou-se uma proporção molar $[\text{Rh}_2(\text{tfa})_4]$: ácido cítrico de 1:14. Uma massa de 0,510 g (0,78 mmol) de $[\text{Rh}_2(\text{tfa})_4]$ foi dissolvida em 60 mL de água e a solução gotejada em 5 mL de outra solução contendo 2,71 g (10,6 mmol) de ácido cítrico previamente aquecida a 70 °C. O volume da solução foi reduzido o máximo possível sem que houvesse secura do material no evaporador rotativo, em seguida foram adicionados 5 mL de água e a solução evaporada novamente. Essa etapa de evaporação e adição de água foi repetida por seis vezes. Na última etapa de redução do volume o composto foi dissolvido em metanol e precipitado pela adição de solução de éter de petróleo e acetona 50:50 (v/v). O sólido foi lavado com acetato de etila por cerca de vinte vezes, para retirada do excesso de ácido cítrico. Finalmente, após a remoção do excesso de acetato de etila (estufa a 60 °C por 12 horas) o sólido foi dissolvido em 20 mL de H_2O . A amostra foi dosada por ICP-OES e a concentração de $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$ foi de 0,058 mol/L.

4.3.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram obtidas inicialmente na fase magnetita (Fe_3O_4) via a coprecipitação alcalina de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} e posteriormente oxidadas à maghemita pelo borbulhamento de gás oxigênio na suspensão (SHRESTHA et al., 2016).

Foram preparados 500 ml de uma solução aquosa contendo 500 mmol de FeCl_2 , 250 mmol de FeCl_3 e 200 mmol de HCl , a qual foi rapidamente vertida (100 ml) em 2.500 mL de 1 molL^{-1} de NH_4OH , sob vigorosa agitação (1000 rpm) à temperatura ambiente, havendo a formação de um precipitado preto (Fe_3O_4) que foi magneticamente separado e lavado com água várias vezes até a solução atingir pH neutro. Em seguida, o pH foi ajustado para cerca de 4 com solução de HCl , e a magnetita produzida foi oxidada para maghemita ($\text{g-Fe}_2\text{O}_3$) utilizando um fluxo de gás de oxigênio, mantendo a suspensão a 80 °C durante 4 h. As nanopartículas preparadas como maghemita (P-NPs) foram lavadas várias vezes e re-suspensa em HNO_3 a 0,01 mol/L.

4.3.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ASSOCIADA AO CITRATO DE RÓDIO

Com base nos resultados de trabalhos anteriores (NUNES, 2010; NUNES *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2011), observou-se que a razão molar R_{adc} igual a 40 $\text{mmol}_{\text{complexo}}/\text{mol}_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ era adequada para obter sóis de nanopartículas estabilizadas com o complexo Rh-cit, sendo esta condição a escolhida para preparação do fluido magnético.

Para preparação do fluido, 1,04 mL Rh-cit foi adicionado a 0,788 mL fluido ácido precursor como discriminadas na tabela 3.

Tabela 3 - Discriminação da condição de funcionalização de nanopartículas para preparação do fluido magnético.

Amostra	Rh-cit mL	H ₂ O mL	γ -Fe ₂ O ₃ mL
MNP - Rh-cit 01	1,04	4,172	0,788

Após a mistura das soluções do adsorvato com o fluido ácido precursor em falcon de 50mL, o pH foi ajustado para 3 com solução de NaOH (0,1 mol/L) e a amostra ficou sob agitação durante 24 h a 25 rpm (IKA TRAYSTER digital). Posteriormente foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm à 23 °C na ultracentrífuga refrigerada (Hitachi) e as nanopartículas sedimentadas foram lavadas por três vezes com água destilada. As NPs foram dispersas em 10 mL e o pH foi ajustado para 7 com solução de NaOH (0,1 mol/L) havendo peptização das nanopartículas e formação de sol estável. As concentrações em ferro e ródio foram dosadas por ICP-OES e estão listadas na **tabela 4**.

Tabela 4 - Concentração final dos fluidos magnéticos

Amostra	mmol/L Fe	mmol/L Rh	mmol/L Fe ₂ O ₃	mmol/L Rh ₂ (cit) ₄
MNP-Rh	290,0	5,8	145,0	2,9

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO MAGNÉTICO

Para a caracterização quanto à distribuição de diâmetro e de carga superficial das nanopartículas, foi utilizado o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern). A técnica DLS baseia-se no movimento Browniano e espalhamento de luz. Potencial Zeta ($P\zeta$) é a alteração que uma partícula adquire em um determinado meio. É dependente do pH, força iônica e concentração de um determinado componente. Para testar a estabilidade da NP ao longo do tempo, foram feitas diluições do fluido em água ultrapura na concentração de 1:1000 para cada leitura. Para testar se houve alterações na NP após incubação com soro sanguíneo, os ensaios foram realizados nas temperaturas de 25°C e 37°C e as medições foram feitas nos intervalos de tempo de: 0h, 12h e 24h. Houve também medições das NPs incubadas e lavadas. O mesmo protocolo serviu para as amostras controle (NP sem adição de soro sanguíneo)

A caracterização morfológica e a mensuração das partículas foram obtidas a partir de MET, MEV e pela técnica de DRX (difração de raios X). Para análise no MET, as amostras do composto foram preparadas com a adição de 10 μ L de 0,2% de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ (0,153 mol/L de ferro) sobre telas de cobre (300 malhas), previamente recobertas com 0,7% de Formvar e metalizada com carbono. As telas foram visualizadas em MET (JEOL JEM-2100, Thermo scientific, 200 kV). Para análise no MEV (JGM 7001F), a amostra do composto foi diluída em água ultrapura numa proporção de 1:1 e pingada sobre o suporte de análise.

Para caracterizar a estrutura cristalina das nanopartículas sintetizadas, medidas de DRX foram efetuadas no pó das partículas obtidas após a evaporação do solvente. A indexação das linhas do espectro de difração permite a identificação da estrutura cristalina bem como a determinação do parâmetro de cela.

A difração de raios X (DRX) é uma técnica analítica versátil e não destrutiva utilizada para avaliação de sólidos cristalinos, o que abrange materiais naturais e sintéticos, revelando informações sobre sua estrutura cristalina (BEDÊ, 2010). A estrutura cristalina é uma

distribuição regular tridimensional de átomos no espaço. Estes átomos permanecem organizados formando, em uma direção, uma variedade de planos paralelos separados entre si por um espaçamento interplanar d , conforme as características do material (**Figura 8**) (FONTANIVE *et al*, 2014).

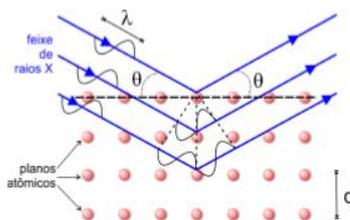


Figura 6- *Figura esquemática da Difração de Raio X.* (FONTANIVE *et al*, 2014).

4.5.OBTENÇÃO DE SORO E SANGUE TOTAL HUMANO

Após aprovar o projeto no Comitê de Ética de Pesquisa, foram utilizadas 20 amostras de soro e sangue total humano. Utilizou-se como critérios de inclusão, doadores de sangue do gênero feminino na faixa etária de 18 a 35 anos da Universidade de Brasília, coletados no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Ciências Biológicas, pela equipe de biomédicos, com todos os cuidados de biossegurança e armazenamento da amostra. Todos os doadores assinaram o TCLE (Anexo 01) como foi estabelecido no projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília – CEP-FS/UnB, (CAAE: 59103416.9.0000.0030; Número: 1.936.932).

4.6.FORMAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA COROA PROTEICA

4.6.1. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO SANGUÍNEO HUMANO EM MAGH-RH₂(H₂CIT)₄

Para formação da coroa proteica, uma suspensão de 500 μ L de fluido magnético (290,0 mmol/L de Fe) foi disperso em ultrassom (Branson 1510 B-series ultrasonic cleaners), durante 10 minutos, 60 Hertz. Depois foi incubada durante 1 hora, a 37°C em tubo de ensaio de 1,5 mL

contendo 500 μ L de soro sanguíneo humano. O mesmo protocolo foi feito para os controles negativos, mas sem a adição de soro à NPs (NP + PBS; NP + Meio RPMI simples).

4.6.2. LAVAGEM/PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO NP/CP

Após a incubação, foi necessário livrar-se do não ligado, proteínas em excesso. Por conseguinte, os tubos foram centrifugados a 16.000g, durante 1 hora a 4°C (Eppendorf-Centrifuge 5424 R, refrigerada, com Rotor FA-45-24-11, keypad, 230 V/50 – 60 Hz) e o sobrenadante foi separado a partir do sedimento. O sobrenadante foi substituído com a mesma quantidade de PBS. Os sedimentos foram lavados quatro vezes com PBS nas mesmas condições do primeiro passo de centrifugação. Os sobrenadantes da amostra NP com soro humano, foram concentrados em *speed vac* a um volume de 100 μ L e depois analisadas por SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio (**SDS**) de poliacrilamida (**PAGE**), quanto ao seu teor de proteína para determinar a eficácia dos passos de lavagem. Depois da primeira centrifugação, todos os peletes foram transferidos do tubo de incubação para um novo tubo de ensaio para evitar sinais de falsos positivos causados por proteínas adsorvidas à parede do tubo de incubação. Pelas mesmas razões, após o último passo de lavagem, os sedimentos foram ressuspensos em 200 μ L de tampão 1X (Tris-HCL 0,0625 M, SDS 2,5%, 5% de 2-Mercaptoetanol, 7% de Glicerol (stok)) e novamente transferidos para novos tubos de ensaio e congelado a -20 °C.

4.6.3. DESSORÇÃO DA COROA PROTEICA DA SUPERFÍCIE DAS NPS

Para a dessorção das proteínas da superfície das NPs, as amostras foram aquecidas a 95°C, durante 10 minutos em incubadora (AccuTherm™ Microtube Shaking Incubator/Labnet). As amostras foram precipitadas por centrifugação a 16.000g, a 25°C, por 30 minutos. Foi coletado o sobrenadante contendo proteínas e utilizado 2 μ L para quantificação quanto ao teor de proteínas. A quantificação foi feita através de um kit de quantificação Qubit® 2.0 Fluorometer da Invitrogen.

Para verificar a presença de proteínas, uma alíquota de cada amostra foi separada para a realização de SDS-PAGE. Para desnaturar as proteínas, as amostras foram fervidas durante 10 minutos à 95 °C em banho-maria, acrescidas por 1/5 de tampão de amostra não ultrapassando o volume de 20 µL por poço, e aplicadas em gel de bis-poliacrilamida 5-12%. A eletroforese foi feita com tampão de corrida em um kit da Bio-Rad a 120 V, durante 1 hora para separar as proteínas por peso molecular. Foi utilizado 15 µL do marcador de amostra. Após o término da corrida, o gel foi corado usando azul colômico de Coomassie 1% (BIO-RAD) por 1 hora de incubação e depois descorado com uma solução descorante (50 mL de água destilada, 40 mL de metanol e 10 mL de ácido acético).

4.6.4. DIGESTÃO TRÍPTICA DE PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DA SUPERFÍCIE DAS NPS

A amostra contendo extratos proteicos foi submetida à digestão trípica utilizando o protocolo de digestão de amostras da Promega (2001) com algumas adaptações. A amostra foi resuspendida em 100 µL de tampão Guanidina (6M+Tris 0,25M, pH 8,6 + DTT 10mM) e reduzida por 1h a 56°C sob N₂ para evitar oxidação da amostra. Em seguida, a amostra foi alquilada com Iodoacetamida (55mM) por 45min a 25°C.

Para remover o SDS presente na amostra, foi utilizada *Amicon* com *cut-off* de 30 kDa, b-Mercapto, DTT, IAA e Guanidina. Após a ultrafiltração a amostra foi liofilizada e resuspendida em 100 µL de tampão bicarbonato de amônio 0,1 Mol/L, pH 8,1 com 2% p/p de tripsina Promega e digerida a 37°C por 20 horas overnight.

Em seguida a amostra digerida foi dessanilizada em *StageTips* para remover o tampão de bicarbonato de amônio. Antes de aplicar a amostra no Orbitrap, uma pequena alíquota foi aplicada no MALDI (Bruker Autoflex II MALDI-TOF/TOF) para verificar se a digestão ocorreu como esperado.

4.6.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

As amostras dos peptídeos trípticos foram analisadas em um sistema cromatográfico com colunas capilares (nano-UHPLC Dionex Ultimante 3000) acoplado *on-line* ao espectrômetro de massas híbrido *ion trap-orbitrap*, Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Os solventes utilizados nas corridas foram: solvente A (0,1% de ácido fórmico em água) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila).

O sistema cromatográfico consistiu de dois tipos de colunas capilares, sendo uma pré-coluna (diâmetro interno de 100 μm \times 20 mm de comprimento), empacotada no laboratório com partículas esféricas de sílica revestidas por C18 ReprosilPur de 5 μm com poros de 120 Å (Dr. Maich GmbH, Ammerbuch, Alemanha). As amostras foram injetadas e o carregamento nessa pré-coluna foi realizado a um fluxo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ de solução, sendo 98 % de solvente A e 2% de solvente B. Essa pré-coluna tem função de reter os peptídeos e é utilizada como um filtro para remover resíduos de sais. A segunda coluna é uma coluna analítica (diâmetro interno de 75 μm \times 35 cm de comprimento), também empacotada no laboratório com partículas C18 Reprosil de 3 μm com poros de 120 Å (Dr. Maich GmbH, Ammerbuch, Alemanha). Os peptídeos foram separados nesta coluna analítica e eluídos utilizando gradientes de 2 a 40 % de solvente B em 170 min, de 40 % - 85% até 185 min, seguido por uma etapa isocrática de 85% até 190 min, retornando para 2 % de solvente B até 210 min para reequilibrar a coluna.

A interface entre nanoLC e o espectrômetro de massa híbrido LTQ Velos Pro Orbitrap Elite (Thermo Scientific) foi feita por meio do controle automático do equipamento, utilizando o *software* Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Scientific). A fonte de ionização utilizada foi *Nanospray flex ion source* (Thermo Scientific), com a voltagem do *spray* ajustada para 2,5 kV e a temperatura do capilar de transferência de 275 °C. Os espectros de MS foram adquiridos no modo positivo, sendo a aquisição dependente de dados [*Data Dependent Acquisition (DDA)*].

O ciclo de DDA consistiu em um *survey scan* compreendendo a faixa de m/z 300-1650 sob a resolução de 120.000 FWHM (Full Width at Half-Maximum) para m/z 400 e com valor-alvo de controle de ganho automático de 1×10^6 íons para todos *scans* no FTMS e tempo máximo de preenchimento de 200 ms. O *survey scan* foi seguido pela fragmentação *MS/MS* por dissociação induzida por colisão (CID) dos quinze íons precursores com cargas múltiplas mais abundantes de cada tempo. Íons com carga +1 foram excluídos da fragmentação, independentemente de sua intensidade. A janela de isolamento para a seleção do íon precursor monoisotópico foi de 2 Th. A opção de *lock mass* não foi habilitada. Íons precursores anteriormente fragmentados foram excluídos de forma dinâmica por 90 s.

4.6.6. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA COROA PROTEICA

Os arquivos raw, provenientes de todas as corridas cromatográficas, foram submetidos ao processamento e à análise de dados no programa PEAKS Studio 7.0 (*Bioinformatics Solutions Inc.*, Waterloo, ON, Canada). Os seguintes parâmetros foram utilizados para análise: tripsina como enzima utilizada; instrumento *Orbitrap*; tipo de fragmentação CID; correção do precursor apenas para massa; qualidade dos filtros de scan maior que 0,65; tolerância para o erro de massa do precursor monoisotópico de 10 ppm; erro de massa para os fragmentos de 0,5 Da; máximo de duas clivagens perdidas por peptídeo; uma clivagem não específica em um terminal do peptídeo; carbamidometilação dos resíduos de cisteína (alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa; acetilação do N-terminal da proteína, oxidação da metionina como modificações variáveis; máximo de três modificações pós-traducionais por peptídeo.

Os dados foram confrontados com o banco de dados *Homo sapiens* (161.549 seqüências, baixado do Uniprot em 05 de janeiro de 2018). Uma taxa de falsos positivos foi estimada com a fusão do banco de dados com um banco *decoy*. A taxa de descoberta de falsos positivos (FDR)

foi habilitada. Para os critérios de identificações finais, foram aplicados os filtros de FDR para peptídeos menor que 1 % e, ao menos, um peptídeo único por proteína.

O arquivo das sequências FASTA da lista de proteínas identificadas foi carregado no software BLAST2GO versão 5.0 (CONESA *et al.*, 2005; CONESA & GÖTZ, 2008; GÖTZ *et al.*, 2008) e nos bancos de dados público STRING, versão 10.5 (<https://string-db.org/>), e no sistema de anotação automática BLASTKOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) utilizando a ortologia do banco de dados Kegg (<http://www.kegg.jp/>).

4.7.INTERAÇÃO DE NPS DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄ COM MACRÓFAGOS HUMANO

4.7.1. LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS E CULTURA CELULAR

A linhagem celular de linfoma de monócitos leucêmicos humanos, U937, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (**Figura 9**).

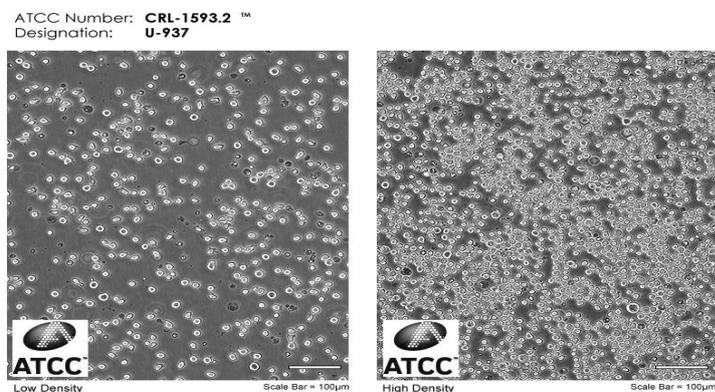


Figura 7 - Células da linhagem U-937. Derivada por Sundstrom e Nilsson em 1974 a partir de células malignas obtidas do derrame pleural de um paciente com linfoma histiocítico.

Fonte: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1593.2.aspx#characteristics>

Após o descongelamento, a linhagem celular foi mantida em cultura em meio RPMI, acrescidos de 10% de soro fetal bovino (SFB) com 1% de antibiótico e mantida em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C.

4.7.2. ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR (MONÓCITO-MACRÓFAGO)

A fim de induzir a diferenciação celular da linhagem U-937 a um fenótipo de macrófago, as células foram semeadas (4×10^5) numa placa de poliestireno de 6 poços (TPP, USA) e incubadas com meio de cultura (RPMI) suplementado com 5 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 48 horas e 72 horas para estabelecer o melhor tempo de diferenciação. Um poço com células controle não recebeu PMA. A concentração do PMA já havia sido estabelecida em outros trabalhos (PARK *et al*, 2007; LORD *et al*, 2012; ESCAMILLA-RIVERA *et al*, 2016). Subsequentemente, as células foram lavadas 1 vez com PBS estéril e incubadas por mais 24 horas em RPMI-1640 sem PMA. Para análise da morfologia celular foi utilizado o microscópio de luz Axiovert e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100. Esse ensaio experimental foi feito em duplicata.

Passada as 24 horas, o meio foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS e retiradas da placa com rodo (cell scraper, 25cm, KASVI) e tripsina. A intenção de usar dois métodos para desaderir as células da placa, foi de avaliar os efeitos da tripsina em relação aos receptores do marcador CD-14. As células separadas foram incubadas durante 30 minutos com anti-CD14 humano conjugado com APC-Alexa flúor 750 (Invitrogen/Life/Thermo) no gelo. Após três lavagens com PBS (centrifugando), as células foram ressuspensas em 400 μ l de PBS e analisadas por citometria de fluxo.

4.7.3. TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Para cada ensaio experimental descrito nos itens a seguir, a linhagem celular U-937 diferenciada, foi semeada em placas de poliestireno de 6, 24 e 96 poços e depois tratadas com nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

Os tratamentos foram feitos de duas maneiras: nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ livre de soro sanguíneo humano (NP/SC) e nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ incubadas com soro

sanguíneo humano (NP/CC). Para este último, foi preparado uma solução de soro sanguíneo humano diluído em meio RPMI sem SFB na proporção 10% e depois misturado com as NPs na mesma quantidade e incubado a 37°C, 1 hora antes do tratamento para formar a coroa proteica. Posteriormente, as células foram tratadas em meio RPMI sem SFB. O meio não suplementado com SFB é importante para não ter interferência de proteínas que não sejam do soro sanguíneo humano.

4.7.4. VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT

O método utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o método colorimétrico do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que é baseado na análise da redução do reagente MTT em formazan, pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais roxos de formazan, formados pela redução do MTT, são quantificados por técnicas de espectrofotometria (HUSASAIN *et al.*, 1993).

Foi semeada uma quantidade de células de 4×10^3 por poço (placa de 96 poços), incubadas por 24 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Logo após, as células foram incubadas com os tratamentos descritos no **item 5.6.3** por períodos variados (24, 48 e 72 h), nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µM de citrato de ródio [2,9 mmol/L]. Após o período de incubação com os tratamentos, o conteúdo dos poços em meio de cultura com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ **com** e **sem** soro sanguíneo humano, foi substituído por uma solução de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT (5 mg/mL em 0,15 M de PBS (Phosphate buffered saline: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4). Foram realizados os mesmos tratamentos em poços vazios (sem células), seguindo as demais etapas do protocolo citado acima. Estes tratamentos em poços sem células tiveram como objetivo eliminar a interferência da coloração dos fármacos na reação colorimétrica analisada no espectrofotômetro. Os valores

destas análises foram utilizados como os “brancos” correspondente a cada tratamento e concentração, para posterior normalização dos resultados.

As células e os “brancos” foram incubados por 2,5 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, o meio de cultura com MTT foi removido e, logo, adicionados 200 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan formados. Foi realizado o branco para o DMSO também. Estes cristais foram quantificados em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices) utilizando comprimento de onda de 595 nm. Para avaliar a viabilidade celular de células tratadas com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em relação ao controle não tratado foi realizada a análise de variância simples, ANOVA two way (Dunnett's multiple comparisons test). As diferenças significativas foram consideradas quando a probabilidade foi menor que 5% (p<0,05).

4.7.5. ANÁLISE DA MORFOLOGIA APÓS O TRATAMENTO COM MAGH-RH₂(H₂CIT)₄ POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a análise da morfologia estrutural das células U-937 diferenciadas, foram semeadas 1×10^6 células em placa de 6 poços (com uma lamínula especial) e após a adesão foram incubadas com 200 µM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com e sem proteína corona durante 1, 3 e 6 horas. Foi feito o controle (poço com células diferenciada (macrófagos) e sem diferenciar (monócitos) sem tratamento com NP). Transcorrido o tempo de incubação, as células foram fixadas com Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,005 M de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) durante a noite a 4°C. Subsequentemente, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas durante 30 minutos com 1% de tetróxido de ósmio. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e desidratadas em gradiente crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) durante 5 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram secas em Ponto Crítico,

montadas em porta espécime e metalizada com Ouro (Au) no “Sputter Coater”. Após essas etapas, as amostras foram analisadas no MEV.

4.8. ESTUDO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄

4.8.1. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a análise da captação de NPs com coroa proteica e sem coroa proteica, 1×10^6 células U-937 diferenciadas, foram semeadas em placa de 6 poços e, após a adesão, as células foram expostas à NPs (200 μ M) durante 3 e 6 horas. As células foram desaderidas com tripsina, recolhidas em microtubos e lavadas com PBS. Depois foram fixadas com Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,005 M de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) *overnight* a 4°C. Subsequentemente, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas durante 30 minutos com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio e 5 mM de CaCl₂. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e depois contrastadas com 0,5% de acetato de uranila a 4°C. As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) durante 10 min cada e incluídas em resina Spurr. As seções ultrafinas foram obtidas com um ultramicrotomo (Leica, UCT, AG, Viena, Áustria) e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão.

4.8.2. QUANTIFICAÇÃO POR ICP

A quantificação das NPs internalizadas nas células, foi determinada usando um espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) Perkin Elmer modelo Optima 8000, com potência de radiofrequência de 1400 W, 1,5 mL de fluxo de amostra min^{-1} , 10 L min^{-1} de argônio fluxo de plasma, fluxo de nebulizador 0,7 L min^{-1} e fluxo de gás auxiliar (árgon) de 0,2 L min^{-1} .

As células diferenciadas foram semeadas (1×10^5) em placas de poliestireno de 24 poços e tratadas com $200\mu\text{M}$ de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ como descrito no **item 5.6.3**. Transcorrido o tempo de incubação (6, 12 e 24 horas), as células desaderidas foram recolhidas em eppendorf de 1,5 mL, lavadas 5 vezes com PBS em centrífuga ($5000\text{rpm}/37^\circ\text{C}/10\text{ min}$). Os sobrenadantes foram recolhidos em falcon de 15 mL para quantificação do ferro não internalizado. As células foram secas em *speed vac* e ressuspensas em $200\ \mu\text{L}$ de HNO_3 . Depois foram transferidas para um falcon de 15 mL e deixado agir por 24 horas. Passadas as 24 horas, foi adicionada água até completar o volume de 5 mL e analisadas no equipamento ICP quanto o teor de ferro na amostra. O mesmo protocolo foi utilizado para os sobrenadantes.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

A solução de nanopartículas foi diluída em água deionizada para caracterização da composição na proporção de 1:1000 (Zetasizer Nano ZS). O pH foi de 6.8 (após 2 anos de síntese). O diâmetro hidrodinâmico médio foi de $147,4 \pm 1.380$, Potencial Zeta de superfície, $P\zeta -40,1\text{ mV}$, com característica monodispersa com PDI (Índice de Polidispersão) $0,171 \pm 0,006$ (**Figura 10**).

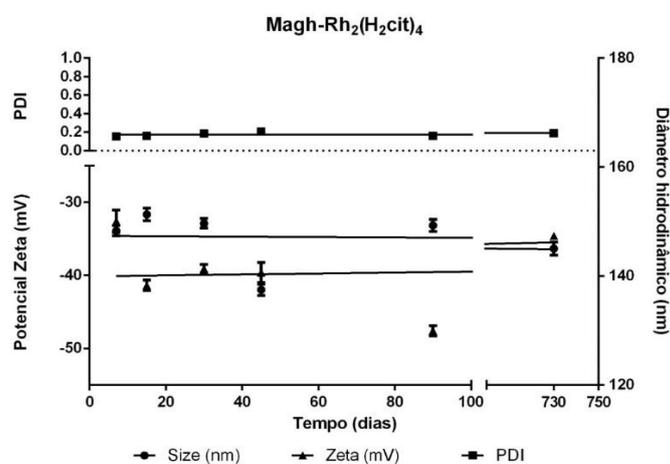


Figura 8 - Análise de estabilidade do composto de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ no decorrer do tempo (7, 15, 30, 45, 90 e 750 dias). (GraphPad Prism 6.0).

A **figura 11 (A)** ilustra uma micrografia da amostra de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, obtida empregando-se um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) JEOL modelo JEM 2100 do Instituto de Física da Universidade de Goiânia - UFG. A dedução da distribuição em tamanho para as amostras foi feita calculando-se o perímetro de um grupamento de nanopartículas, tomadas em diferentes micrografias totalizando aproximadamente a contagem de 500 partículas. Esse processamento foi feito com o auxílio de um *software* de análise semi-automática de imagens. O tamanho médio mensurado por MET foi de 9,65 nm, moda 9,4 nm (**Figura 11 B**).

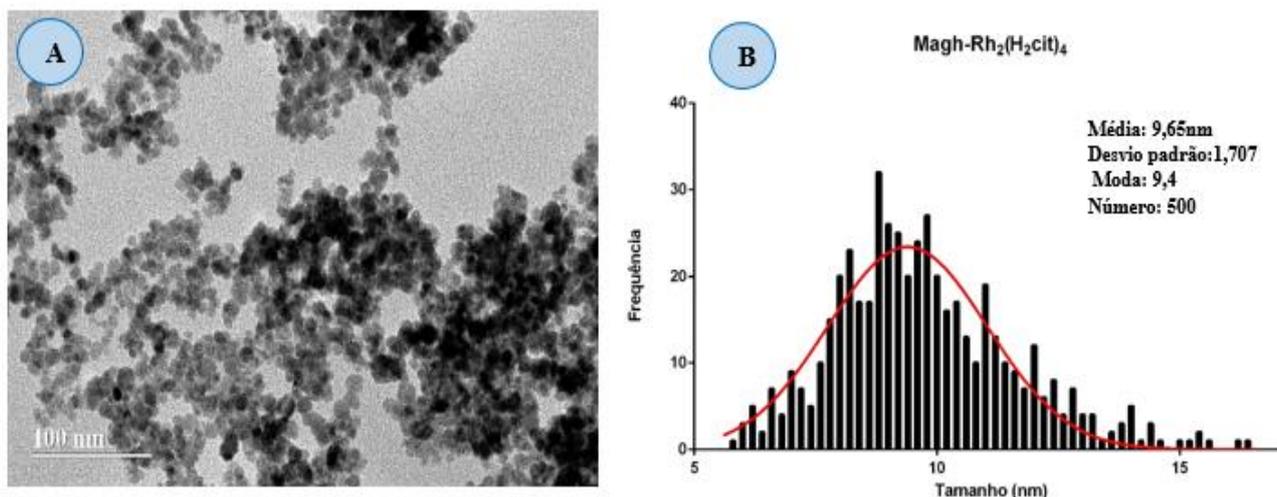


Figura 9 - Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) Micrografia eletrônica de nanopartículas de maghemita associadas com citrato de ródio (II) ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$). (B) Histograma da distribuição dos diâmetros de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Média: 9,65 nm \pm 1,707; Número: 500; Moda: 9,4 nm (GraphPad Prism 6.0).

A **figura 11 (B)** apresenta o histograma de tamanho correspondente às partículas exibidas na micrografia. A função que melhor ajusta o histograma do tipo log-normal, é dada pela expressão:

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}sd} \exp \left[-\frac{1}{2s^2} \left(\ln \frac{d}{d_0} \right)^2 \right]$$

em que d_0 é o diâmetro característico ($\ln d_0 = \langle \ln d \rangle$) e s é a largura característica da polidispersão relacionada à distribuição. O diâmetro mais provável para a distribuição é dado

por $d_{mp} = d_0 \exp(-s^2)$ e o diâmetro médio $\langle d \rangle = d_0 \exp(-s^2/2)$. Os diâmetros característicos e de raios X (d_{RX}) podem ser correlacionados por $d_{RX} = d_0 \exp(2.5s^2)$.

A **figura 12 (A)** exibe o espectro de difração de raios X para as nanopartículas de maghemita associada ao citrato de ródio sintetizadas neste trabalho, obtido utilizando-se a radiação K_α do cobre ($\lambda = 0,15418$ nm), em que a intensidade difratada varia em função do ângulo de difração 2θ . A relação existente entre o ângulo de difração, o comprimento de onda da radiação λ e as distâncias interplanares da estrutura d_{hkl} são formalizadas pela lei de Bragg (HAMMOND, 1997):

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$$

em que n é a ordem da interferência. As distâncias interplanares, calculadas pela expressão anterior, e a intensidade relativa dos picos de difração podem ser comparados com os valores do banco de dados da ASTM (*American Society for Testing Materials*) para a maghemita. Essa comparação possibilita a indexação dos picos característicos, associados às famílias de planos (hkl) da estrutura cristalina. No caso da amostra medida, confirma-se a estrutura do tipo cúbica de espinélio (**Figura 12 B**).

O alargamento das linhas de difração decorre principalmente da dimensão finita do cristal. Outras fontes, oriundas do arranjo experimental e dos erros instrumentais, são subtraídas usando-se um monocristal padrão. Desta forma, utilizando-se a fórmula de Scherrer (KLUG & ALEXANDER, 1962), que relaciona a dimensão dos nanocristais com a largura de feixe difratado, é possível deduzir o tamanho médio das nanopartículas:

$$d_{RX} = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

em que β é a largura à meia altura do pico de difração e k vale 0,896. A partir do difratograma referente à amostra de Magh-Rh₂(H₂cit)₄, o diâmetro médio encontrado foi de $d_{RX} = 9,75$ nm o que corrobora com o resultado encontrado na mensuração feito por MET (**Figura 11 B**).

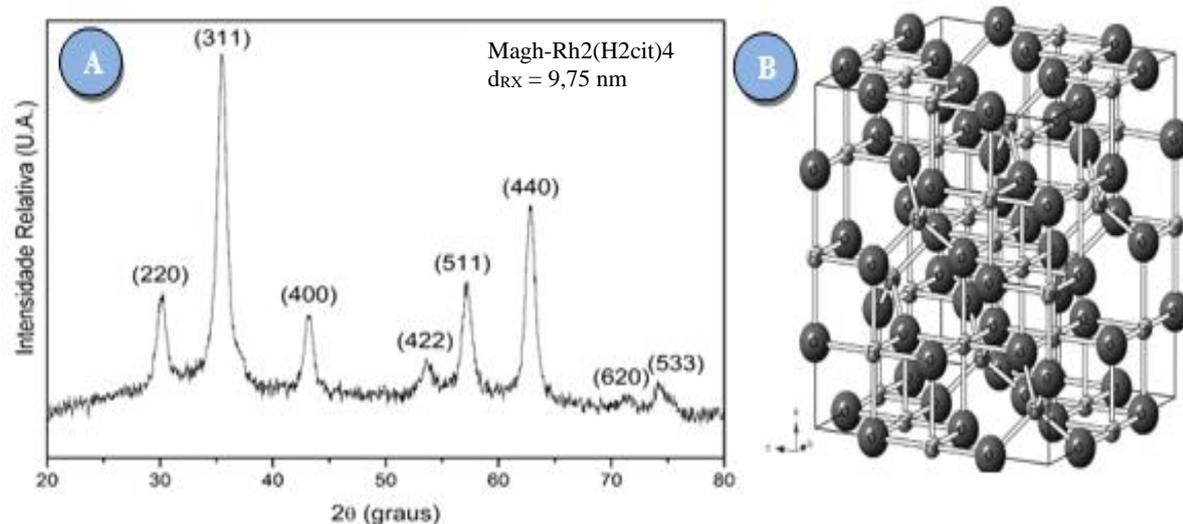


Figura 10 – Difratoograma de raios X do composto $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ (A). Estrutura cristalina da maghemita (B) (OLIVEIRA; FABRIS & PEREIRA, 2013).

A **figura 13** (A) mostra a morfologia de aglomerados da nanopartícula de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Apesar da imagem ser de um aglomerado, pode-se perceber uma morfologia esférica, que foi confirmado na imagem feita por MET, **figura 11** (A).

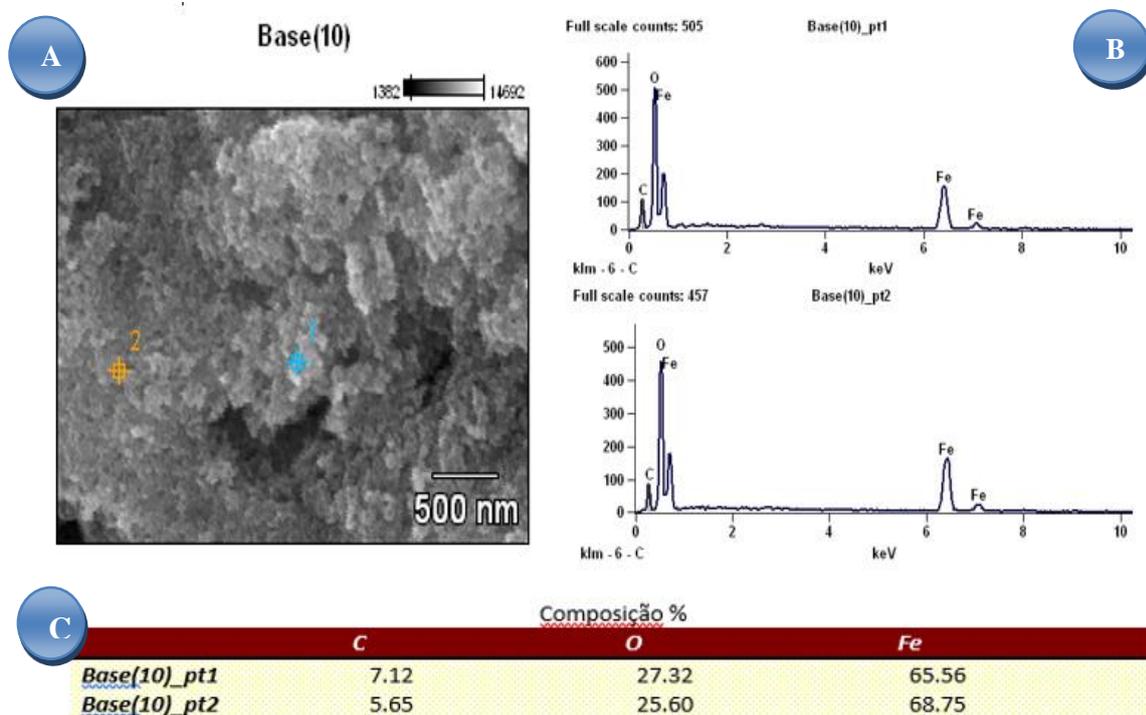


Figura 11 – Caracterização morfológica e composição da nanopartícula de maghemita por Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Micrografia eletrônica de nanopartículas de maghemita associadas com citrato de ródio (II) ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$). (B) Gráfico da composição da amostra feito por EDS/EDX. (C) Valores em porcentagem da composição dos elementos detectados nos dois pontos marcados na micrografia (pt1 e pt2).

Ao realizar EDS/EDX (Espectroscopia de raios X por dispersão em energia) (**Figura 13 B e C**), obteve-se a composição elementar química da amostra em análise. Nos dois pontos escolhidos na imagem foram detectados os elementos Carbono, Oxigênio e Ferro.

Foi feita uma análise sobre alguns tipos de diluentes possíveis para diluir o fluido. O composto Magh-Rh₂(H₂cit)₄, apresentou-se estável quando diluído em água e meio de cultura com soro sanguíneo humano. No entanto, quando diluído em PBS ou meio de cultura simples (sem SFB ou soro humano), demonstraram instabilidade (**Figura 14**).

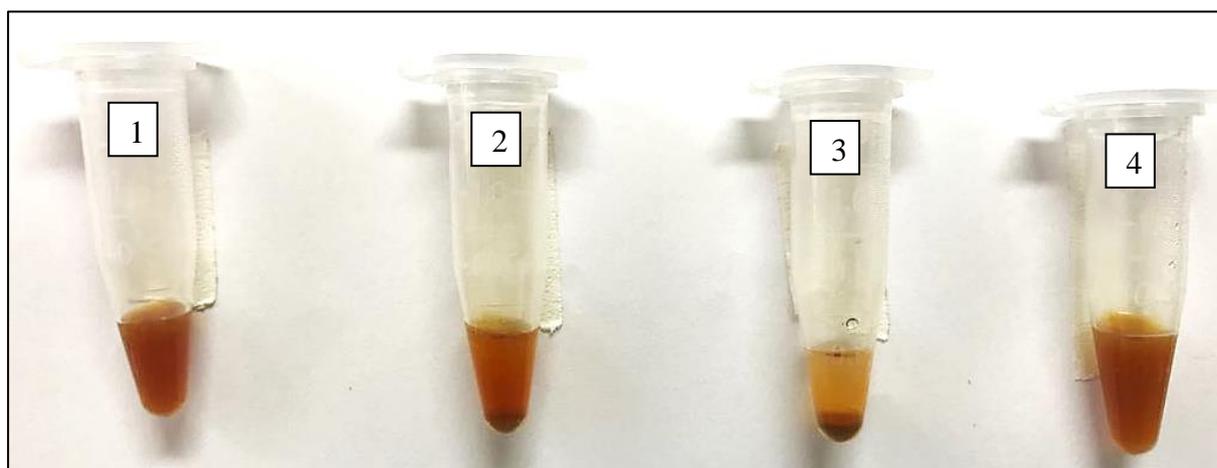


Figura 12 - Estabilidade de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ em diluentes diferentes. 1 - NP + H₂O; 2 - NP + PBS; 3 - NP + Meio simples (sem SBF); 4 - NP + Meio + soro sanguíneo humano. Houve precipitação de NPs na amostra 2 e 3.

6.2.ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA EM NANOPARTÍCULA DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄APÓS INCUBAÇÃO COM SORO SANGUÍNEO HUMANO

Para obter esses resultados também foi utilizado o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern). Foram preparados 02 tipos de amostras (NP+H₂O e NP+H₂O+Soro) e deixadas em temperaturas diferentes (25°C e 37°C). As medições foram realizadas nos tempos de 0 hora, 12 horas e 24 horas de incubação. O Índice de Polidispersão (PDI) manteve-se monodisperso nas amostras analisadas, com exceção da incubada com soro na temperatura de 25°C que mostrou uma elevação no índice no decorrer das horas (**Figura 15 A e Tabela 7**).

Foi detectado um aumento no diâmetro hidrodinâmico (DH) das NPs após a incubação com o soro. De 149,7 nm aumentou para 158,0 nm. Notou-se uma diferença de diâmetro em decorrência da temperatura. As amostras submetidas à temperatura de 25°C teve um aumento maior no decorrer do tempo. Com 24 horas de incubação, as NPs à 25°C estavam com 208,3 nm e as NPs à 37°C com 174,7 nm de tamanho (**Figura 15 B e Tabela 7**).

Antes da incubação, as NPs demonstraram uma carga superficial negativa de -43 mV, com uma pequena variação na amostra submetida a 37°C. Após a incubação, a carga superficial negativa diminuiu (-12,7 mV) e não houve variações relevantes no decorrer do tempo e nem dependente da temperatura (**Figura 15 C e Tabela 7**).

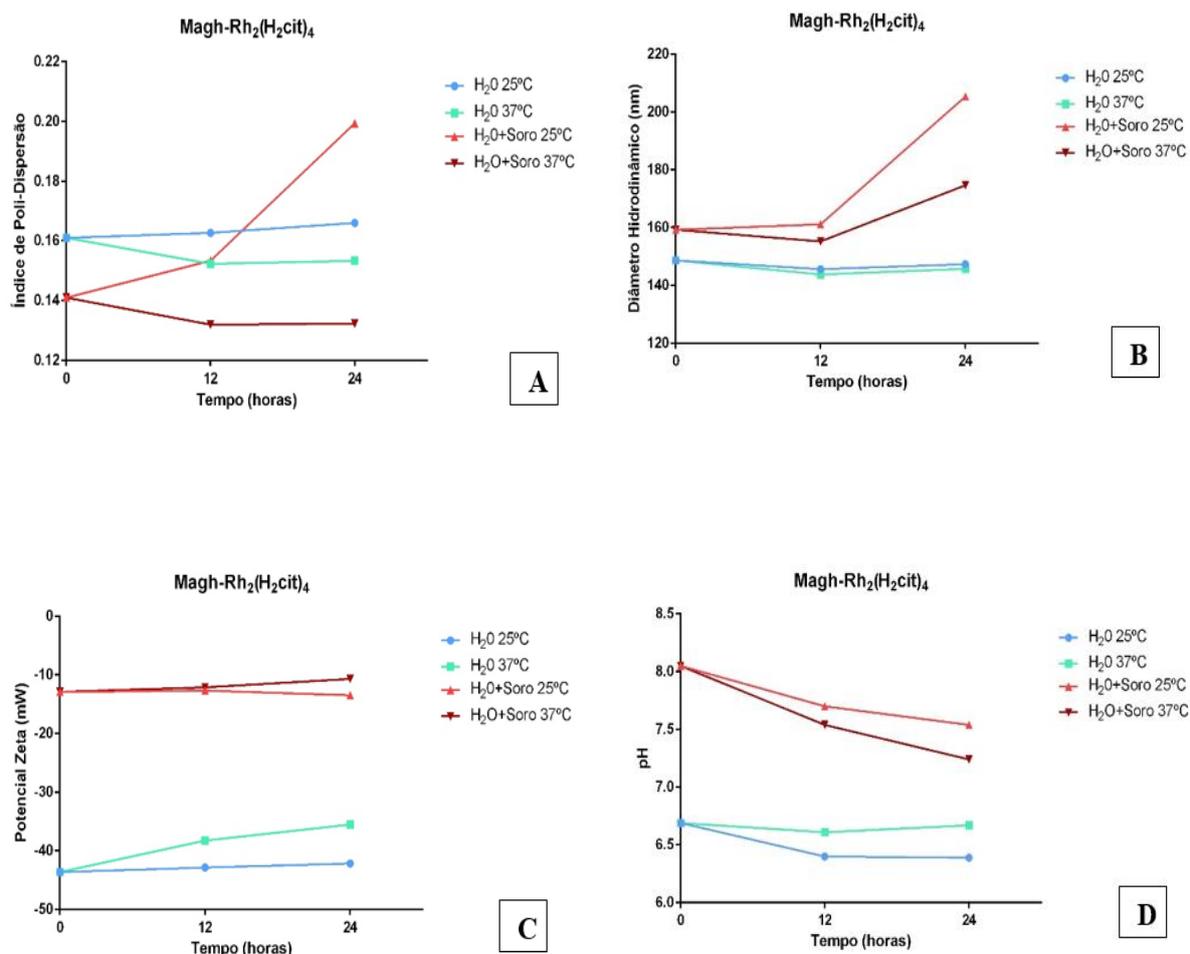


Figura 13 - Análise físico-química da amostra de $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ com e sem adição de soro humano, no decorrer do tempo (0H, 12H e 24H) em diferentes temperatura (25°C e 37°C). (A) Índice de polidispersão. (B) Diâmetro Hidrodinâmico. (C) Potencial Zeta. (D) pH. (GraphPad Prism 6.0).

O pH também foi alterado após a incubação. De 6,69 passou para 8,05, sendo percebido uma ligeira neutralização no decorrer do tempo (**Figura 15 D e Tabela 5**).

Tabela 5 - Discriminação das médias obtidas na análise da amostra de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ incubada com soro sanguíneo humano e diluída em água (controle).

Magh-Rh ₂ (H ₂ cit) ₄					
	Tempo (horas)	H ₂ O 25°C	H ₂ O 37°C	H ₂ O+Soro 25°C	H ₂ O+Soro 37°C
PDI	0	0,173 ± 0,131	0,173 ± 0,131	0,117 ± 0,148	0,117 ± 0,148
	12	0,143 ± 0,188	0,145 ± 0,147	0,157 ± 0,156	0,107 ± 0,156
	24	0,155 ± 0,158	0,128 ± 0,16	0,206 ± 0,193	0,131 ± 0,124
SIZE	0	149,7 ± 148,5	149,7 ± 148,5	158 ± 160,5	158 ± 160,5
	12	143,6 ± 146,5	141,2 ± 143,9	160,1 ± 161,6	155,1 ± 155,3
	24	147,9 ± 147,7	145,5 ± 146,9	208,3 ± 204,3	174,7 ± 176,2
ZETA	0	-43 ± -43,1	-43 ± -43,1	-12,7 ± -13,3	-12,7 ± -13,3
	12	-43,1 ± -42,7	-37,9 ± -38,5	-12,6 ± -12,4	-12 ± -12,3
	24	-42,7 ± -41,9	-35,2 ± -35,2	-13,8 ± -13,2	-11,1 ± -10,7
pH	0	6,69	6,69	8,05	8,05
	12	6,4	6,61	7,7	7,54
	24	6,39	6,67	7,54	7,24

Além disso, foi realizado medições do composto depois de incubado e lavado como descrito no **item 5.5.2**. Com esse resultado comparativo, descrito na **figura 16 e tabela 6**, ficou evidenciado que mesmo depois de livrar-se das biomoléculas não ligadas, o diâmetro hidrodinâmico ainda continua maior do que a NP sem soro. O índice de polidispersão aumentou, provavelmente devido as lavagens por centrifugação e pela eliminação do soro que como

analisados na **figura 15 A**, torna as NPs monodispersas. O potencial zeta diminui novamente, mas ainda continua maior do que da amostra sem soro.

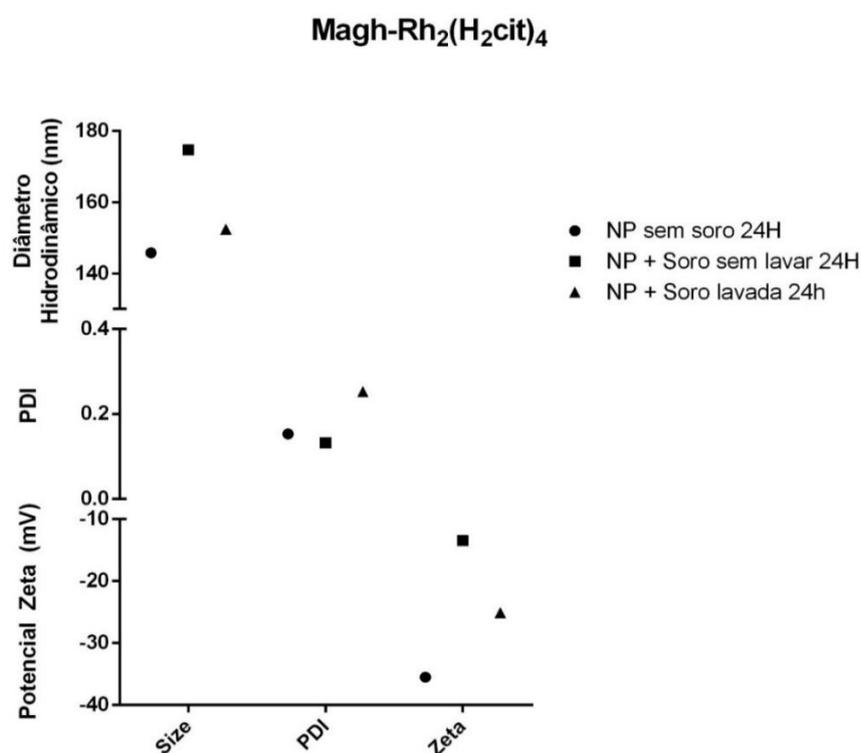


Figura 14 - Análise físico/química do composto de *Magh-Rh₂(H₂cit)₄* sem soro e com adição de soro humano sem lavar e depois de lavada. Diâmetro hidrodinâmico, PDI e Potencial Zeta. (GraphPad Prism 6.0).

Tabela 6 - Discriminação das médias obtidas na análise do composto de *Magh-Rh₂(H₂cit)₄* sem soro e com adição de soro humano sem lavar e depois de lavada.

	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NP sem soro (24h)	145,8 ± 0,984	0,153 ± 0,023	-35,5 ± 0,520
NP + soro sem lavar (24h)	174,7 ± 1,500	0,132 ± 0,010	-13,4 ± 0,305
NP + soro lavada (24h)	152,4 ± 0,945	0,253 ± 0,004	-25,1 ± 1,081

Foram realizadas imagens em MET das três situações (NP sem soro, NP incubada com soro sem lavar e NP incubada com soro lavado) a fim de perceber a coroa proteica. Pelas micrografias (**Figura 17**), nota-se que não há diferença morfológica nas NPs e isso se deve ao

fato de que proteínas apresentam eletrodensidade baixa, impossibilitando a visualização por esse tipo de tecnologia.

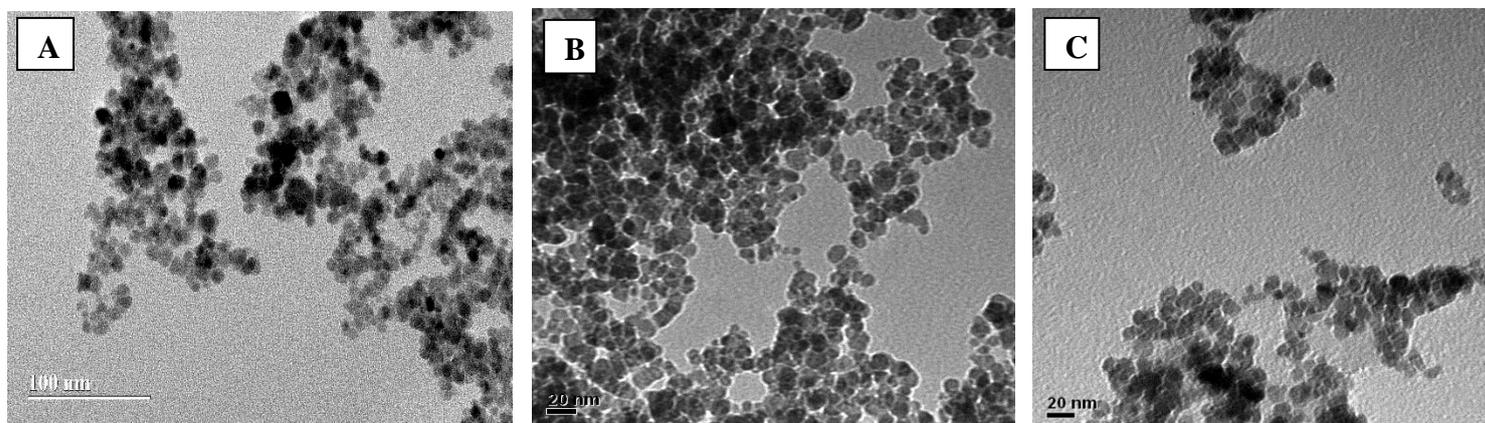


Figura 15 - Micrografias de nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ por Microscópio Eletrônico de Transmissão. (A) NP sem soro. (B) NP incubada com soro sem lavar. (C) NP incubada com soro lavado.

6.3. IDENTIFICAÇÃO DA COROA PROTEICA DAS NPs DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄

Após os passos de lavagens, descrito no **item 5.5.2**, 15µL de cada lavagem foi preparado para eletroforese para avaliar o grau de pureza das amostras (**Figura 18**). Ficou evidenciado que 4 lavagens são suficientes para livrar-se do não-ligado.

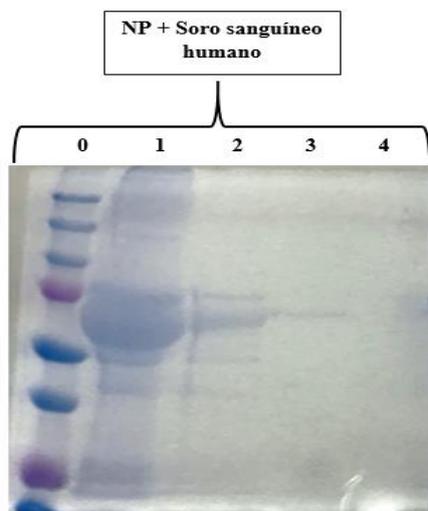


Figura 16 - Gel de acrilamida com os passos de lavagem. 0 – marcador; 1, 2, 3 e 4 foram as lavagens sucessivas realizadas na amostra de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ incubada com soro sanguíneo humano.

Após a dessorção da coroa proteica das NPs como descrito no **item 5.5.3**, 2 μ L do sobrenadante foi utilizado para quantificar o teor proteico. A amostra possuía 84 μ g de proteínas.

Outro gel de eletroforese foi preparado também para as amostras controle (NP + PBS, NP + Meio RPMI simples) (**Figura 19**). Esse teste foi realizado para certificar-se de que não haveria proteínas na NP antes da incubação com o soro e nem no meio simples (sem SFB), garantindo assim, a pureza da NP e certificando-se de que as proteínas adsorvidas na superfície das NPs eram de fato do soro sanguíneo humano. As amostras seguiram o mesmo protocolo de preparo da amostra principal (NP + soro).

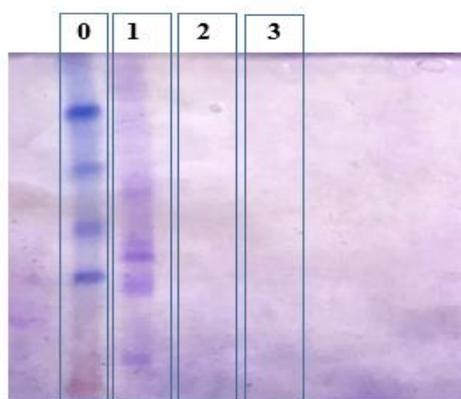
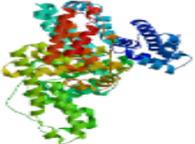
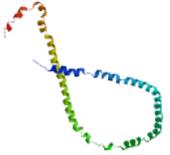
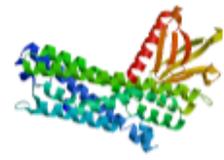
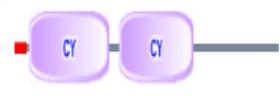
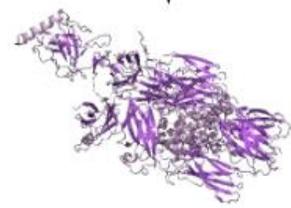
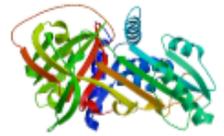


Figura 17 - Gel de acrilamida dos controles negativos. 0 - marcador; 1 - NP + soro sanguíneo humano; 2 - NP + PBS; 3 - NP + meio RPMI simples (sem SFB).

A proteômica analisada por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) identificou 83 proteínas com FDR (False discovery rate, taxa de descoberta de falsos positivos) menor que 1%. As sequências do arquivo FASTA foram carregadas em outros bancos de dados público (citados no **item 5.5.6**). Cada proteína identificada foi categorizada manualmente, de acordo com a função biológica. Não foram caracterizadas as proteínas sem informação ou com a função desconhecidas. Das 83 proteínas, 68 foram devidamente caracterizadas (**Tabela 07**). Dentre elas, 01 albumina, 40 IgGs, 05 apolipoproteínas (APOA1), 05 serpinas, 01 proteína do complemento (C5), 02 quinases (AKAP 13), 06 haptoglobinas, 04 glicoproteínas e 04 transferrinas.

Tabela 7 - Proteínas da Coroa Proteica de nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

PROTEÍNA	LOCAL	FUNÇÃO	ESTRUTURA 3D
ALB – Albumina sérica (609 aa)	Produzida no fígado, encontrada no espaço extracelular;	Regulação da pressão osmótica coloidal do sangue.	
APOA1 - Apolipoproteína A-I (267 aa)	Produzida principalmente no fígado, encontrada no espaço extracelular;	Participa no transporte inverso do colesterol dos tecidos para o fígado.	
IgG - Imunoglobulinas: IGL1 (216 aa) IGLL1 (215 aa) IGLL5 (214 aa) IGK (214 aa) IGHG2 (326 aa) IGKC (107 aa) IGG1 (449 aa) IGH (470 aa)	Produzidas pelos plasmócitos. Encontradas no espaço extracelular.	Resposta imune inata; Ativam a célula B	 (IGLL5)
C5 - Complemento C5 (1676 aa)	Espaço extracelular	Resposta imune inata e adquirida. Ataque a membrana. Ativam macrófagos.	

AKAP13 – Proteína âncora de quinases13 <i>(2817 aa)</i>	Espaço extracelular	Catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP	
HP - Haptoglobina <i>(406 aa)</i>	Produzida no fígado. Encontrada no meio extracelular.	Ligam-se na hemoglobina, reciclam o ferro; age também com antibacteriano.	
AHSG - Glicoproteína Alpha-2-HS <i>(367 aa)</i>	Produzida nos hepatócitos. Encontrada: espaço extracelular; lúmen do retículo endoplasmático; aparelho de Golgi;	Endocitose, regulação da resposta inflamatória, desenvolvimento cerebral e formação de tecido ósseo;	 Estrutura 3D desconhecida.
TF - Transferrina sérica <i>(698 aa)</i>	Espaço extracelular, lúmen do retículo endoplasmático, membrana plasmática.	Atividade transportadora transmembrana de ferro dos locais de absorção e degradação do heme para os de armazenamento e utilização.	
Serpina 1 - (Alfa-1 antitripsina) <i>(418 aa)</i>	Produzida principalmente no fígado, encontrada no espaço extracelular	Atua como uma antiprotease. Principal função: inativar a elastase neutrofílica;	

6.4. INTERAÇÃO DA NP DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄ COM MACRÓFAGOS

6.4.1. DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM U-937

Park et al. (2007) demonstraram que o PMA à 5 ng/mL induz a adesão da célula e a diferenciação de THP-1 para macrófagos, o mesmo pode ser observado para U-937. Ficou evidenciado que o tempo de incubação de 72 horas foi o melhor, como pode ser observado pela mudança de morfologia (**Figura 20 e 21**).

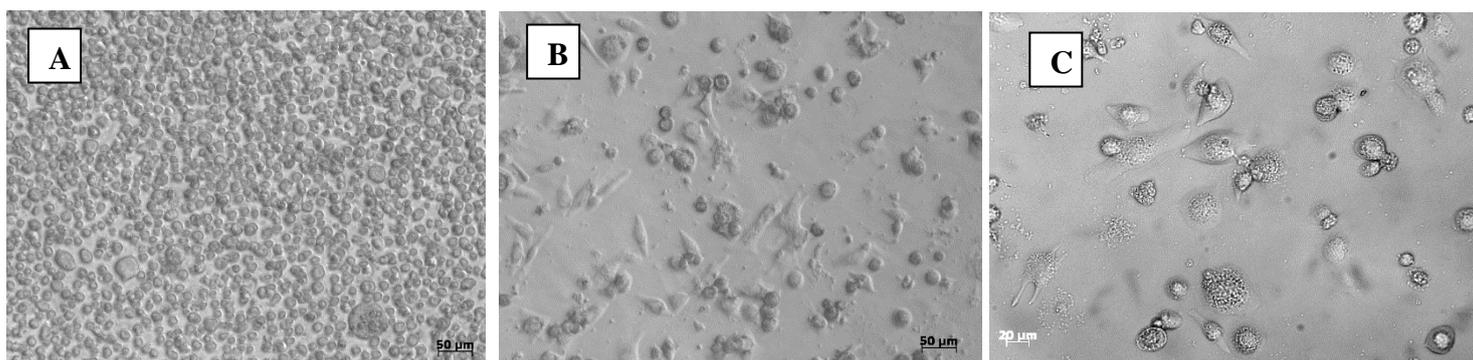


Figura 18 - Micrografias da diferenciação celular da linhagem U-937 por Microscópio de luz. (A) controle; (B) 48 horas de exposição ao PMA; (C) 72 horas de exposição ao PMA.

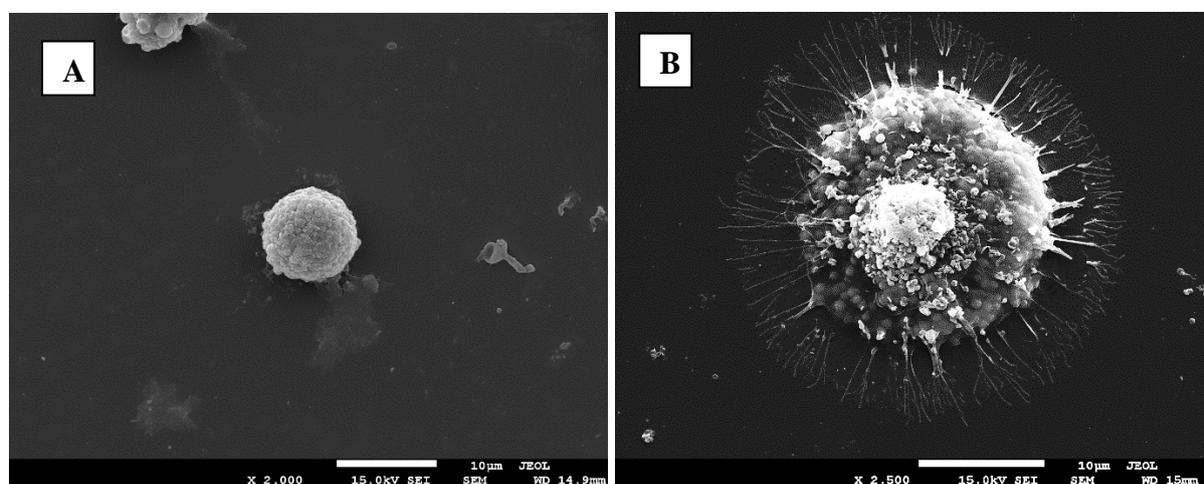


Figura 19 - Micrografias Eletrônica de Varredura da linhagem U-937 antes e depois da diferenciação. (A) monócito sem incubação com Forbol 12- miristato 13- acetato; (B) macrófago derivado do processo de diferenciação induzida com Forbol 12- miristato 13- acetato.

Ainda, para assegurar que esse tempo de exposição com essa concentração (5ng/mL|72 horas) foi suficiente para diferenciação celular, foram analisados os níveis de expressão de CD14, o qual é um marcador de superfície de macrófagos. Através da observação da morfologia

(Figura 20 e 21) e pela marcação do CD14, analisado por citometria de fluxo, percebeu-se que o tempo de 72 horas induz 53,4% de diferenciação, sendo esse tempo escolhido para os demais experimentos (Figura 22 e 23). Além disso, o melhor método de desaderir as células da placa para análise em citômetro é com o rodo (cell scraper, 25cm, KASVI), visto que a tripsina tem influência na expressão do CD14, como pode ser analisado na figura 24.

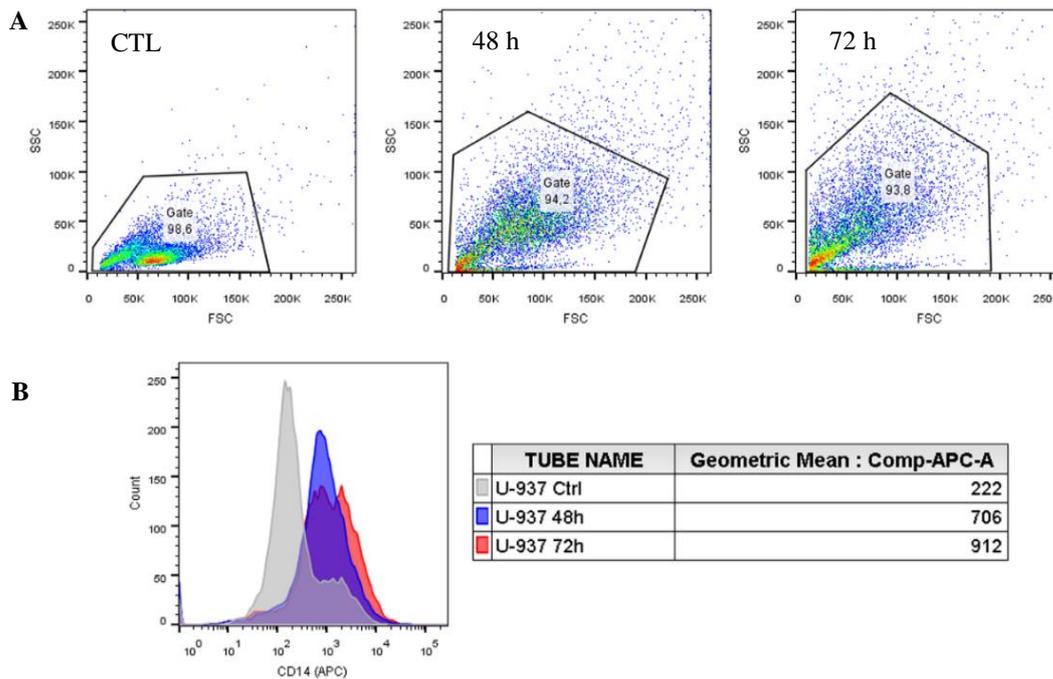


Figura 20 - Análise da diferenciação celular da linhagem U-937 por citometria de fluxo por fluorescência do marcador CD14. (a) Monócitos controle e Populações celular CD14+ após o período de incubação com PMA por diferentes períodos (48/72h). (b) Contagem de células que apresentam CD14 como marcador de superfície. Em cinza tem-se a população controle, em azul, população com período de incubação de 48 horas e em vermelho de 72 horas. Flow Jo v.5.2.7, Tree Star, Inc.

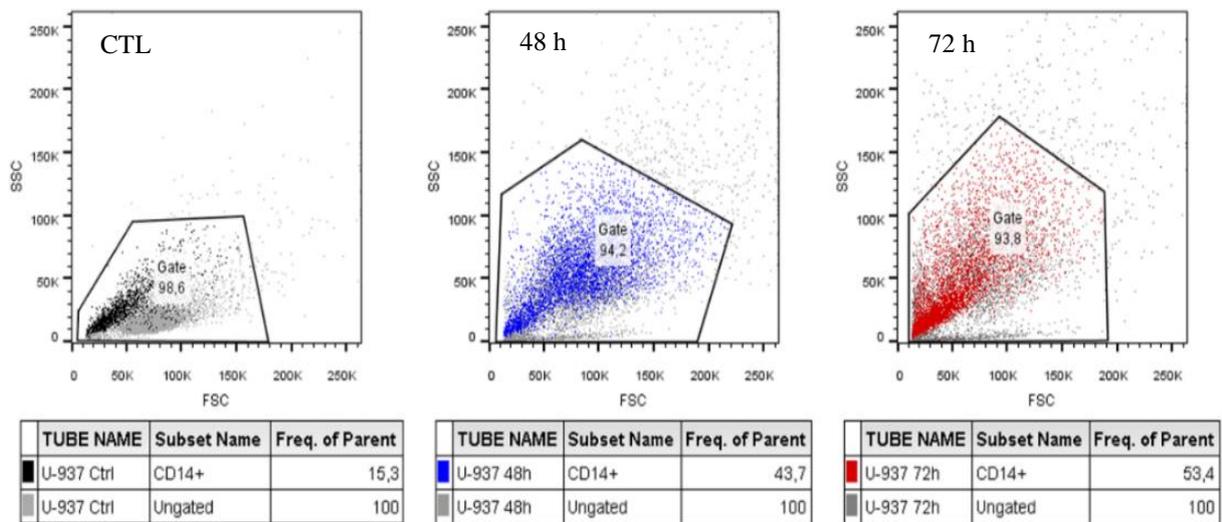


Figura 21 - Análise por citometria de fluxo do percentual de diferenciação por Forbol 12-miristato 13-acetato da linhagem U-937 de populações de macrófagos CD14+ e monócitos. Flow Jo v.5.2.7, Tree Star, Inc.

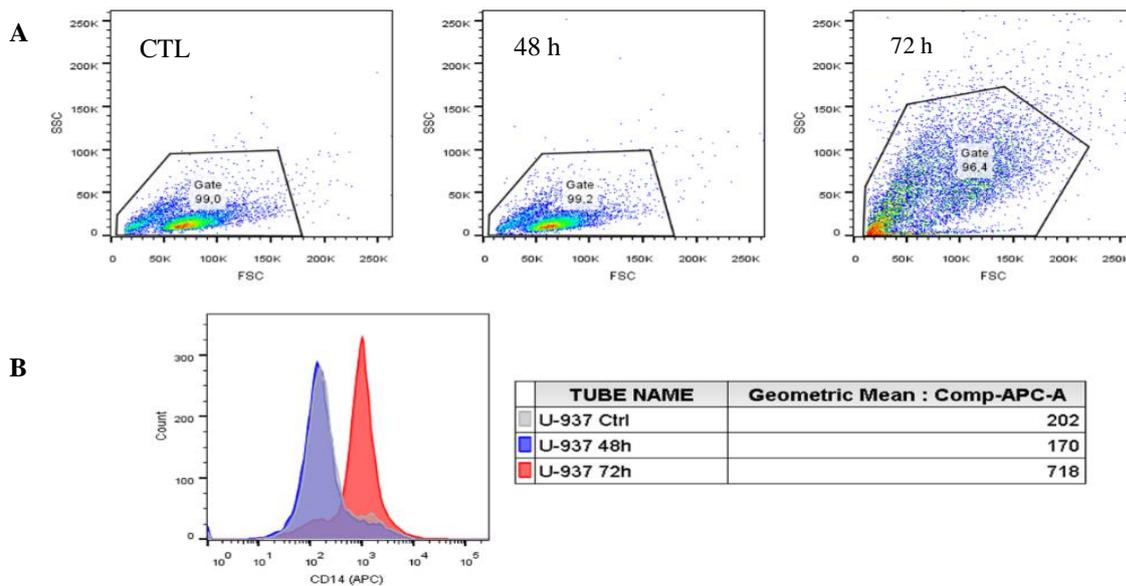


Figura 22 - Análise comparativa de estudo da interferência da tripsina nos receptores de CD14. (a) Monócitos controle e Populações celular CD14+ após o período de incubação com PMA por diferentes períodos. (b) Contagem de células que apresentam CD14+ como marcador de superfície. Em cinza tem-se a população controle, em azul, população com período de incubação de 48 horas e em vermelho de 72 horas. Flow Jo v.5.2.7, Tree Star, Inc.

6.4.1. VIABILIDADE CELULAR

O tratamento contendo Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sem soro sanguíneo humano (NP/SC), promoveu maior redução da viabilidade nas células do que Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com soro sanguíneo humano (NP/CC) (Figura 25).

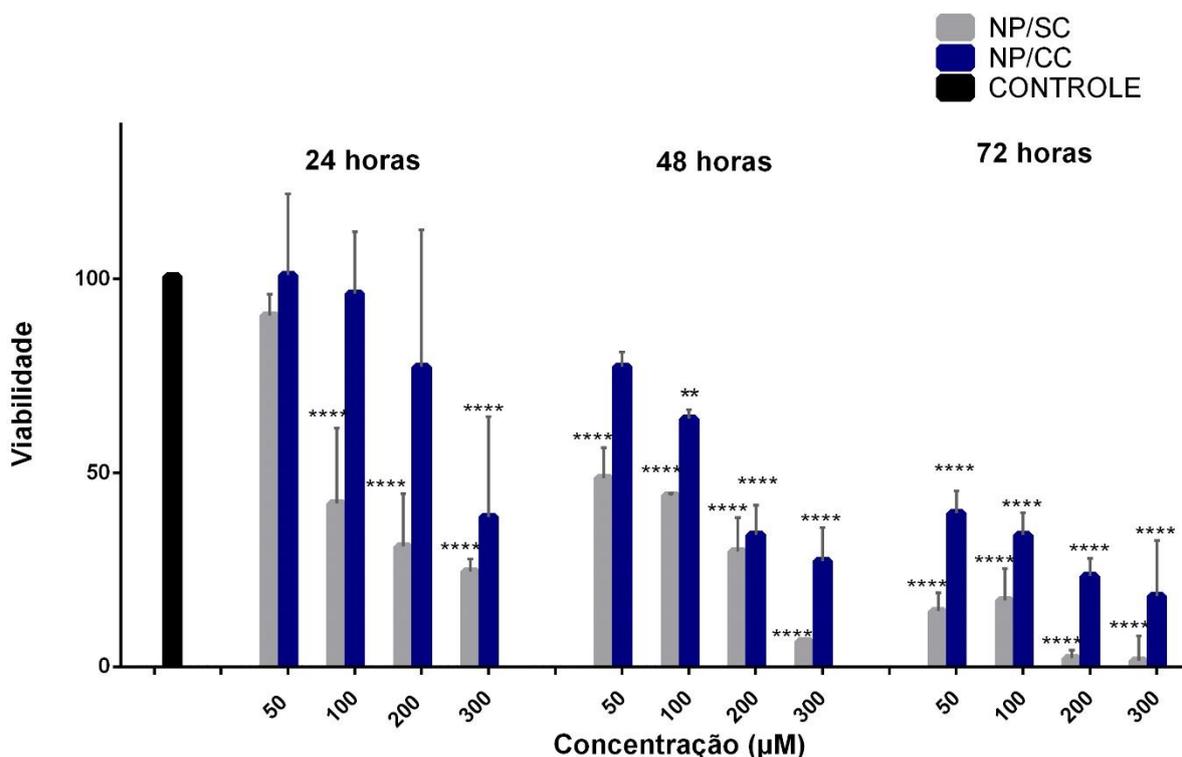


Figura 25 - Viabilidade celular em macrófagos humano (U-937) após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os tratamentos utilizados foram: Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sem soro sanguíneo humano (NP/SC) e Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com soro sanguíneo humano (NP/CC), 2,9 mmol/L de citrato de ródio nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µM de citrato de ródio. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Somente na concentração de 50 µM, após 24 horas de incubação que as células tratadas com NP/SC não obtiveram diferença significativa em relação ao controle. Já as células tratadas com NP/CC no tempo de 24 horas, obteve diferença significativa apenas na concentração de 300 µM. Após 48 horas, foi observado que a partir de 100 µM as células apresentaram redução de viabilidade com maior intensidade nas concentrações de 200 e 300 µM. Com 72 horas de exposição, a redução de viabilidade é intensa em todas as concentrações. Nota-se porém, que

apesar da diminuição da viabilidade em ambos os experimentos, NP/SC é mais citotóxico do que o tratamento NP/CC.

6.4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM CELULAR U-937 APÓS TRATAMENTOS COM MAGH-RH₂(H₂CIT)₄

Após a diferenciação celular, as células foram incubadas a uma concentração de 200 μ M de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ - com proteína corona (NP/CC) e sem proteína corora (NP/SC) - e depois processadas e analisadas em MEV e MET.

Para análise em MEV, as células ficaram expostas ao tratamento durante 1, 3 e 6 horas. Pelas micrografias, é possível observar a interação das NPs com as células e a diferença morfológica com o passar das horas. As imagens da esquerda (**Figura 26 – A, C e E**), são das células tratadas com NP/SC e as da direita (**Figura 26 – B, D e F**), NP/CC.

A solução NP/SC, por precipitar na presença de meio sem soro, como foi demonstrado na figura 14, parece formar uma “malha” na superfície celular, sendo evidentemente notável no tempo de 3 horas (**Figura 26 - C**). Passadas as 6 horas de incubação, as células apresentam-se com morfologia alterada (**Figura 26 – E**). A solução NP/CC, por ser homogênea e estável, como foi demonstrado nas figuras 14 e 15, promove uma interação diferenciada com a célula e de certo modo, aumentando a sobrevida celular (**Figura 26 - F**).

NP-SC

NP-CC

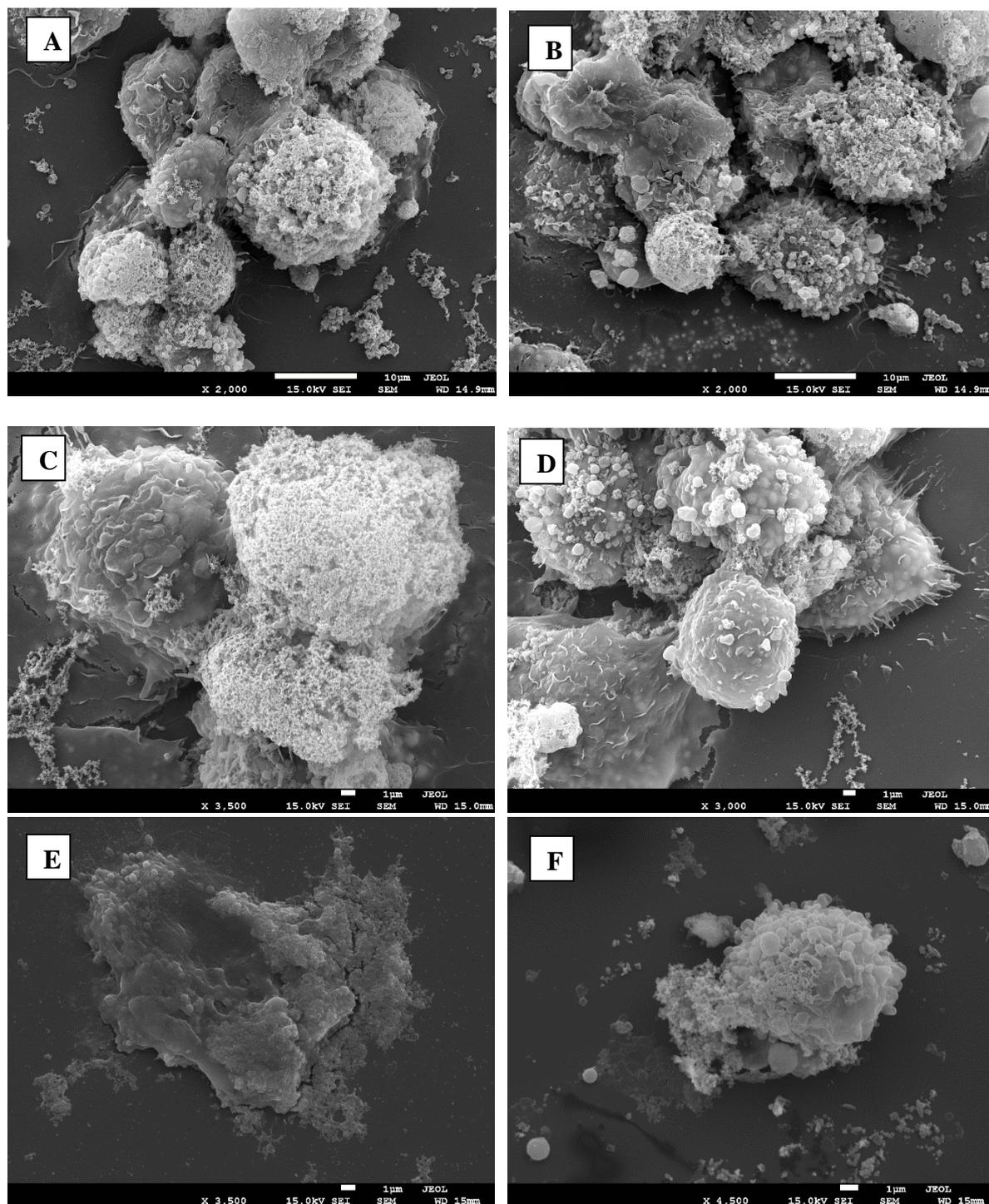


Figura 26 - Micrografias eletrônicas de varredura de células expostas a $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ na ausência (NP-SC) e presença (NP-CC) da proteína corona. A e B – 1 hora de incubação; C e D – 3 horas de incubação; E e F – 6 horas de incubação.

Foi realizado EDS em 5 pontos distintos das imagens para conferir a composição química do material que envolve as células. Foi computado uma média de 23,05% de ferro e 7,2% de ródio nas células tratadas com NP/SC e 3,2% de ferro e 1,7% de ródio nas células

tratadas com NP/CC (**Figura 27**). Esse resultado corrobora com o que foi constatado visualmente. Nota-se, portanto, que o tratamento NP/SC, encobre a membrana celular das células em maior proporção do que o tratamento NP/CC.

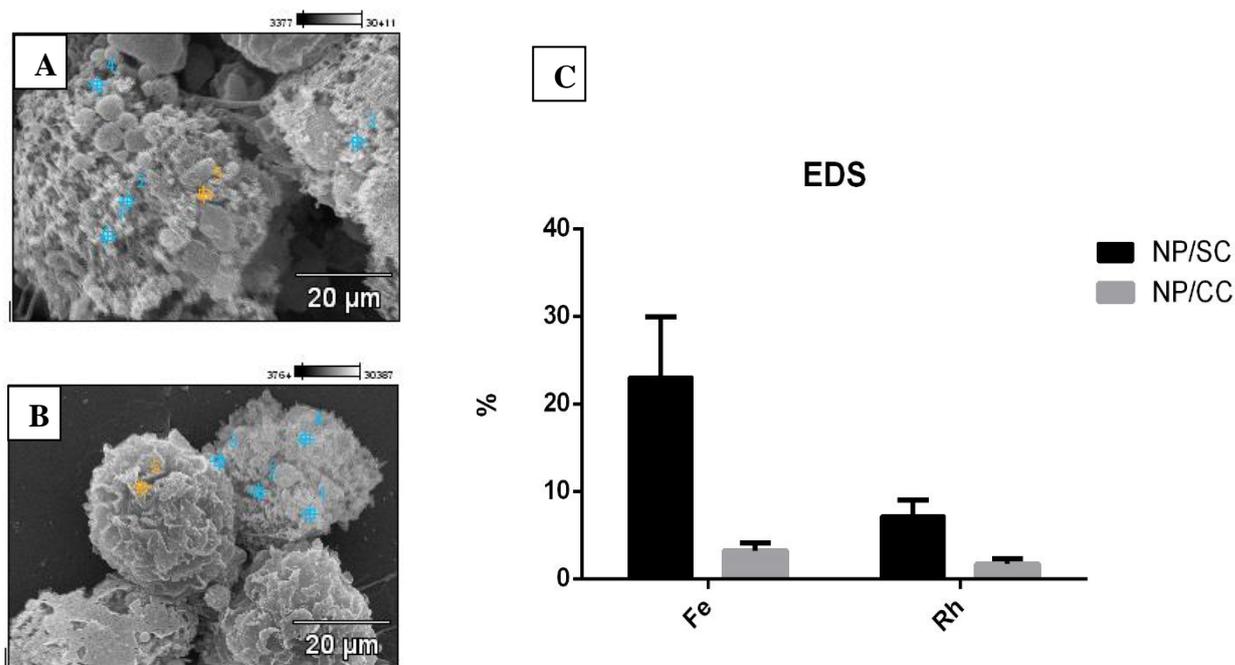


Figura 27 - EDS realizado nas micrografias das células tratadas com $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. (A) EDS das células tratadas com NP/SC. (B) EDS das células tratadas com NP/CC. (C) Gráfico das médias do EDS obtidas nos 5 pontos de cada imagem.

Para análise ultraestrutural em MET, as células ficaram expostas durante 3 e 6 horas. Não obtivemos amostra suficiente para fazer imagens das células que receberam tratamento com NP/SC após 6 horas. Acredita-se, segundo imagens obtidas no MEV (**Figura 26 E**), que após 6 horas de tratamento uma grande quantidade de células morreram.

Após 3 horas de exposição, as imagens das células tratadas com NP/SC, mostraram grandes aglomerados de NPs dentro de citoplasma em vacúolos e fora deles envolvendo a superfície da membrana celular (**Figura 28 A**). Já as imagens das células tratadas com NP/CC (**Figura 28 B**), revelaram alguns aglomerados no conteúdo citoplasmático e algumas NPs dispersas tanto no citoplasma quanto no núcleo. Não foi observada grandes quantidades de NPs envolvendo a membrana celular como na figura 28A, porém é visualizado endocitose.

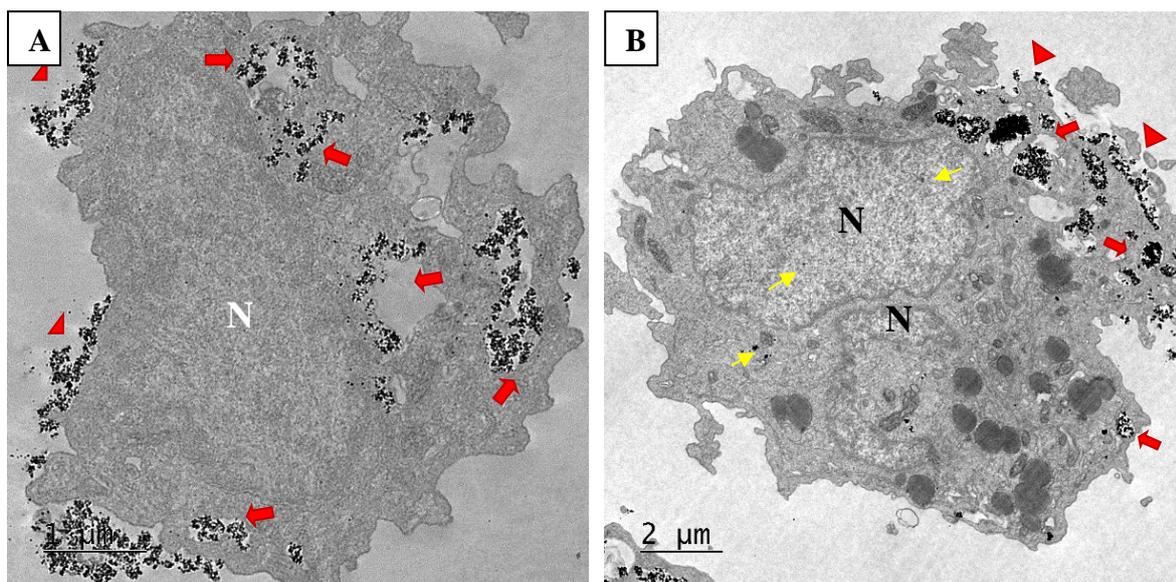


Figura 28 - Micrografia eletrônica de transmissão de macrófagos expostos a 200 μ M de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ durante 3 horas. (A) Tratamento NP/SC. A imagem apresenta grandes aglomerados de NPs no conteúdo citoplasmático dentro e fora de vacúolos (indicado por seta) e uma quantidade substancial de NPs envolvendo a membrana plasmática (cabeça de seta). (B) Tratamento NP/CC. A imagem mostra alguns aglomerados em vacúolos no citoplasma (indicado por seta vermelha) e a presença de algumas NPs dispersas no núcleo e no conteúdo citoplasmático (indicados por setas amarelas); Aglomerados de NP interagem com a membrana celular (cabeça de seta).

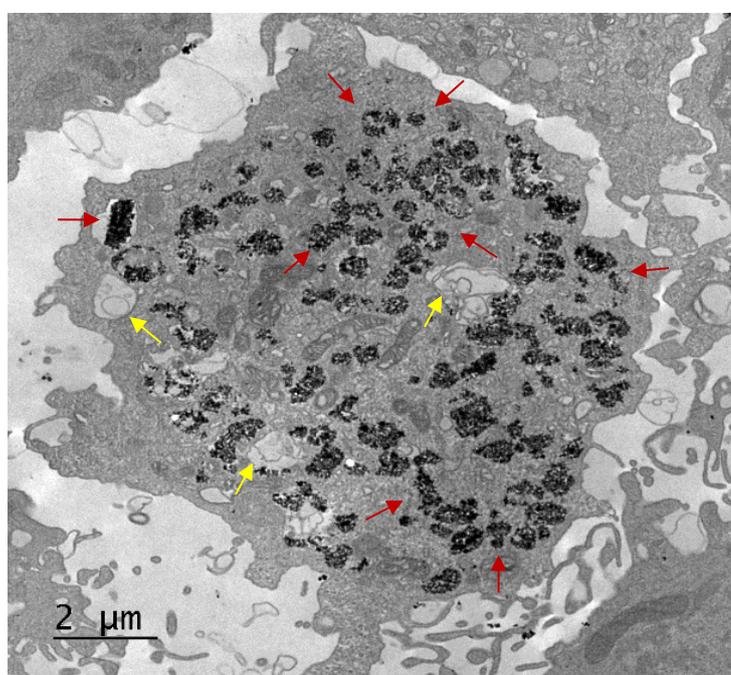


Figura 29 - Micrografia de macrófago exposto a NP/CC por 6 horas. Nota-se a presença de vários aglomerados de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ no conteúdo citoplasmático (seta vermelha) e outras vesículas com resíduos de digestão celular (seta amarela).

Quando submetida à exposição de NP/CC por 6 horas, as células apresentam-se com uma grande quantidade de aglomerados NPs internalizadas no citoplasma dentro de vesículas. Não são observadas NPs na superfície da membrana celular (**Figura 29**).

6.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄

As células foram expostas a 200 μM de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ durante 6, 12, e 24 horas. A quantificação foi baseada em μmol/L de Fe₂O₃.

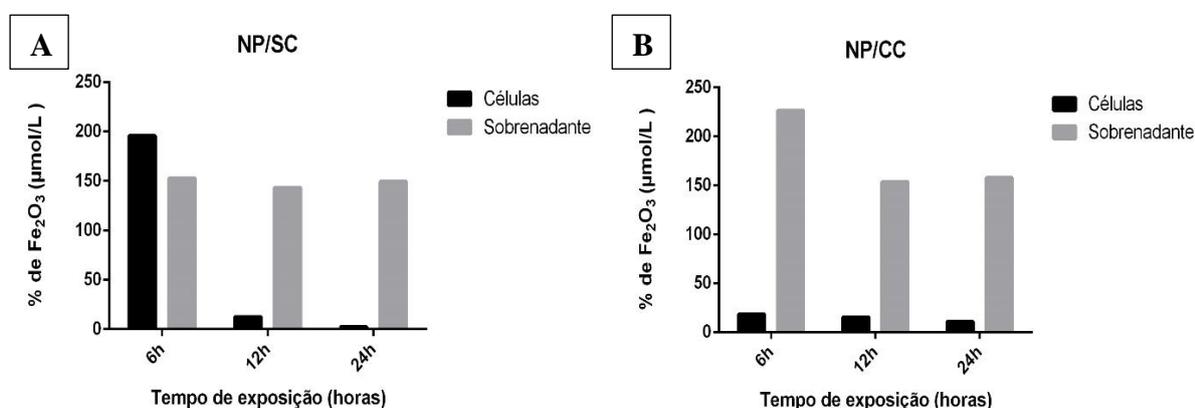


Figura 30 - Quantificação de Fe₂O₃ internalizado em macrófagos humano tratado com Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sem soro (NP/SC) (a) e com soro (NP/CC) (b) no decorrer do tempo (6, 12 e 24 horas). Foi realizada a análise quantitativa de Fe₂O₃ não internalizado (sobrenadantes).

As células que receberam o tratamento NP/SC após 6 horas de exposição apresentaram um valor de 48,5 μmol/L. Esse valor, no entanto, pode se referir à nanopartículas aderidas na membrana plasmática que, mesmo após sucessivas lavagens não desgrudaram (observe as figuras 26 e 28). Após 12 horas, a concentração diminuiu drasticamente para 3,1 μmol/L, alcançando 0,58 μmol/L no tempo de 24 horas. Com base nas micrografias, esse fato pode ser explicado pela provável morte das células consequentemente, extravasamento do conteúdo interno. Já as células que receberam o tratamento NP/CC, internalizam 4,6 μmol/L com 6 horas de exposição, diminuindo para 3,8 μmol/L no período de 12 horas e 2,7 μmol/L, com 24 horas (**Figura 30**). Essas células tiveram sobrevida maior porém, manteve estabilidade na quantidade

de NPs internalizadas fato esse diagnosticado pelas micrografias e pelo ensaio de viabilidade com MTT.

7. DISCUSSÃO

A utilização de nanomateriais no campo da biomedicina tem mostrado resultados promissores, porém, elucidar todos os mecanismos e respostas do sistema fisiológico é desafiador. A caracterização do nanomaterial torna-se imprescindível antes de qualquer análise *in vitro* ou *in vivo*, uma vez que, a cada nova síntese os parâmetros são diferentes, mesmo seguindo o mesmo protocolo.

As nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ apresentou pH estável mesmo depois de 2 anos de síntese (pH = 6,8). O diâmetro hidrodinâmico médio foi de 147,4 ± 1,380, Potencial Zeta de superfície, $P\zeta$ -40,1 mV, com característica monodispersa com PDI (Índice de Polidispersão) 0,171 ± 0,006. De acordo com Hunter (2013), medições de potencial zeta proporcionam um critério importante para conferir a estabilidade de um sistema coloidal. O potencial zeta é dependente do pH, força iônica e concentração de um determinado componente. Devido ao caráter anfotérico da superfície de óxidos de ferro, os íons H⁺ e OH⁻ são responsáveis pela carga da superfície sendo assim chamados de íons determinantes do potencial (LYKLEMA, 1995).

Em meio ácido as nanopartículas de maghemita possuem densidade de carga positiva em decorrência da existência de grupos hidroxilas protonados presentes na superfície. Com o aumento do pH, a carga da superfície é reduzida o que provoca uma diminuição na magnitude do potencial de superfície (ψ_s) das partículas e do potencial zeta ($p\zeta$) (NUNES, 2010).

As amostras analisadas se mostraram aniônicas, semelhantes a outros resultados (CARNEIRO *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2014; CHAVES *et al.*, 2015). A regra geral para a estabilidade eletrostática da solução é a faixa de potencial zeta de -30 mV a +30 mV (BEDÊ, 2010). Se o potencial da solução estiver fora dessa faixa, então a solução pode ser considerada instável (CHAVES, 2013), como no caso do resultado do complexo estudado.

Segundo Chaves (2013), o diâmetro hidrodinâmico pode referir-se a aglomerados e não à nanopartículas isoladas. Isso explica a variação de tamanho em relação ao mensurado de forma isolada por meio de micrografia de MET e por DRX. O diâmetro hidrodinâmico médio foi de 147,2 nm, já o tamanho médio mensurado por MET foi de 9,65 nm, moda 9,4 nm e por DRX foi de 9,75 nm.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite a visualização de imagens diretas das partículas ou de aglomerados das mesmas. Foi observado que as nanopartículas em estudo são aproximadamente esféricas e apresentam certa polidispersão em tamanho. Essas características também foram encontradas em outros trabalhos (CARNEIRO, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2011; 2013; 2015; PEIXOTO, 2012; DRUMMOND *et al.*, 2012; CHAVES, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2014; CHAVES *et al.*, 2015). O DRX é uma técnica versátil que permite conferir a estrutura do nanomaterial e o tamanho médio das partículas. No caso da amostra medida, confirma-se a estrutura do tipo cúbica de espinélio (OLIVEIRA; FABRIS & PEREIRA, 2013) com um tamanho médio de 9,75 nm.

Ainda para conferir a composição química do material em estudo, foi realizado um EDS/EDX via MEV. A versatilidade de MEV encontra-se na possibilidade da captação e medida das diversas radiações provenientes das interações elétron-amostra. Estas interações podem revelar informações da natureza da amostra incluindo composição, topografia e morfologia (LIMA, 2009). Como era esperado, elementos químicos como Carbono, Oxigênio e Ferro foram encontrados em grandes quantidades na amostra.

Um dos grandes problemas encontrados na diluição de nanopartículas para administração biológica, como por exemplo no tratamento *in vitro*, é o fato das NPs alterarem a estabilidade dependendo do meio em que é diluído (CHAVES, 2017). O fluido Magh-Rh₂(H₂cit)₄, ao ser diluído em PBS e em meio RPMI sem soro, houve precipitação da NPs mostrando-se instável nesses dois diluentes. Porém, ao ser diluído em água e em meio de cultura

RPMI com adição de soro sanguíneo humano, mostrou-se estável. A água mantém as propriedades coloidais do fluido magnético e a presença do soro com formação da coroa proteica estabiliza-o.

Foi feita uma análise das NPs antes e após incubação com o soro sanguíneo humano utilizando o aparelho Zetasizer. Os nossos resultados sugerem que as proteínas estabilizam a dispersão das NPs, impedindo aglomerações, mas que é dependente da temperatura, sendo observado um aumento na polidispersão da amostra incubada a 25 °C. Houve aumento no diâmetro hidrodinâmico das NPs após a incubação com o soro e uma diferença de tamanho em decorrência da temperatura. Na temperatura ambiente o diâmetro era de 149,7 nm e aumentou para 158,0 nm na temperatura de 37 °C e vai aumentando no decorrer das horas. Isso indica o “efeito vroman” (VROMAN, *et al.*, 1980). E o aumento no diâmetro é percebido até mesmo quando a amostra é lavada. Além do mais, foi identificado também que a presença do soro diminui a carga negativa da superfície das NPs e altera o pH. Estes resultados indicam uma conjugação de proteínas do soro na superfície das NPs reduzindo a sua energia livre e realizando um efeito neutralizante. Schaffer e colaboradores (2013) também obtiveram resultados semelhantes em NPs de ouro. É sabido que, as proteínas corona alteram o tamanho e a composição interfacial de um nanomaterial, dando-lhe uma nova identidade biológica (RAHMAN *et al.*, 2013).

O complexo NP-CP, é dinâmico por natureza e depende também de fatores como ambiente local, temperatura, concentração e o tipo de plasma/soro, tempo de incubação, dentre outros fatores. Sendo assim, a corona pode variar, principalmente a coroa mole que interage com o meio circundante. Walkey e Chan (2012), identificaram 125 proteínas de plasma em superfícies de um “adsorvato” de NP. A coroa mole reflete a abundância relativa de proteínas do soro ou plasma. De acordo com O’Brien & Shea (2016), elas são de ligação fraca, mas com

o passar do tempo, a força de cisalhamento pode alterar o tamanho ou composição do complexo NP-CP.

Em nosso estudo, identificamos 68 proteínas de soro sanguíneo humano adsorvidas em Magh-Rh₂(H₂cit)₄ que foram representadas na **tabela 07**. A albumina é a proteína mais encontrada em coroas proteicas de diversos nanomateriais (CEDERVALL *et al.*, 2007a; CASALS *et al.*, 2010; WALCZYK, *et al.*, 2010; MONOPOLI *et al.*, 2011; FLEISCHER & PAYNE, 2012; FLEISCHER, KUMAR & PAYNE, 2013) sendo ela a mais abundante no soro (55%) (ADKINS *et al.*, 2002; PIEPER *et al.*, 2003). No entanto, as proteínas de baixa abundância, tais como imunoglobulinas, apolipoproteínas e fibrinogênio, também são encontradas na coroa (CEDERVALL *et al.*, 2007a; MONOPOLI *et al.*, 2011; BARRÁN-BERDÓN *et al.*, 2013), e em alguns casos, em concentrações superiores a albumina, como foi observado na coroa proteica de Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

Proteínas como, albumina, imunoglobulinas, proteínas do complemento, fibrinogênio, apolipoproteínas e transferrina são proteínas que tendem a se ligar mais fortemente a nanomateriais e têm demonstrado promover opsonização, fagocitose e endocitose (KARMALI & SIMBERG, 2011; RAHMAN *et al.*, 2013). Rahman e colaboradores (2013), fizeram uma revisão de literatura e diagnosticaram que a transferrina, haptoglobina, fetuína A (alfa-2-HS-glicoproteína), quinogênio, glicoproteína rica em histidina e fatores de contato (intrínsecos) da via de coagulação podem ser atraídos por nanopartículas de polímero com componente superficial hidrofóbico ou nanopartículas inorgânicas hidrofílicas. A maioria dessas proteínas é capaz de aderir às superfícies aniônicas e metálicas. Isso justifica a presença de algumas delas na superfície da Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

Além das proteínas corriqueiras (citadas anteriormente), foram identificadas a quinase e a serpina (Alfa-1 antitripsina). Essas proteínas não são comuns dentro a composição da coroa proteica dos nanomateriais. A quinase (AKAP13), catalisa a fosforilação de proteínas por meio

da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP (MANNING, *et al.*, 2002). Zhu, *et al* (2017) investigaram a estrutura da coroa proteica de hidroxapatita magnética e descobriram que a mesma melhora a proliferação celular devido a ativação da via de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno. Sakulku *et al.* (2014), compararam e caracterizaram a composição da coroa proteica dura em SPION revestidos com PVA e dextrano com diferentes cargas superficiais (positiva, negativa e neutra) e dentre as proteínas identificadas, a alfa-1 antitripsina, foi encontrada somente em SPIONs revestido com dextrano de carga positiva. A nanopartícula em estudo (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) apresenta potencial zeta negativo, que aumenta depois de incubado com o soro, mas como já foi discutido, os nanomateriais possuem características distintas, como por exemplo, o tamanho, a funcionalização, a curvatura e etc., assim sendo, as proteínas adsorvem na superfície das NPs devido a afinidades de ligações entre proteína e NPs, bem como interações entre proteína-proteína. O que se sabe é que a proteína corona é complexa e não existe uma coroa proteica “universal” para todos os nanomateriais e que as densidades relativas das proteínas adsorvidas não se correlacionam com suas abundâncias relativas no plasma. Assim, a composição da proteína corona é única para cada nanomaterial e depende de muitos parâmetros (RAHMAN *et al*, 2013).

A coroa proteica afeta o destino das nanopartículas em um ambiente biológico e, identificá-las tornou-se crucial para a aplicação da nanotecnologia. O complexo identificado aqui neste trabalho (coroa proteica), contribui para a caracterização e estudo em meio biológico da nanopartícula de Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

A identidade biológica das NPs devido à formação da CP determina as interações com as células e pode resultar em efeitos deletérios, como imunotoxicidade. Os ensaios envolvendo a linhagem celular U-937 diferenciada em macrófagos são importantes pois, os mesmos podem impedir que as NPs cheguem ao seu destino. Foi percebido que o fluido magnético diluído em meio sem soro (NP/SC) é instável, citotóxico e promove contato direto com a membrana

celular, uma vez que precipita formando uma malha encobrindo a célula. A quantificação de forma pontual obtida por EDS/EDX, além de conferir a composição do material que encobre as células, comprova que a quantidade de NPs na membrana celular das células tratadas com NP/SC é superior em relação ao tratamento NP/CC.

No resultado de quantificação por ICP-OES, observamos um aumento na quantidade de Fe_2O_3 das células tratadas com NP/SC à NPs. Esse valor pode se referir a NPs que continuaram grudadas na membrana, mesmo após sucessivos passos de lavagens. Nas horas seguintes (12 e 24 horas), é observado um decréscimo de quase 100% na quantidade de Fe_2O_3 . Com base na análise das micrografias e no gráfico de viabilidade, isso pode ter acontecido devido a morte celular e o extravasamento do conteúdo interno. Já o tratamento NP/CC também mostrou-se citotóxico, provocando morte celular. Mas demonstrou estabilidade (não houve precipitação) e o processo de endocitose ocorreu de forma controlada, provavelmente pela sinalização de proteínas adsorvidas na coroa proteica, haja vista que, como já foi discutido, a albumina, imunoglobulinas, proteínas do complemento, apolipoproteínas e transferrina são proteínas que promovem opsonização, favorecendo o reconhecimento por macrófagos, promovendo a fagocitose e endocitose. Walkey, *et al.* (2011), comprovaram que a internalização por macrófagos dependente do soro (com coroa proteica) é mais eficiente que a captação independente de soro (sem coroa proteica), presumivelmente como resultado de diferenças na força de interação das nanopartículas com as células. Em nosso trabalho, as observações das micrografias eletrônicas e análise dos dados quantitativos, presume-se que a coroa proteica em $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ facilita a internalização celular das NPs pelo reconhecimento de proteínas adsorvidas na superfície, haja vista que são proteínas que promovem o reconhecimento imunológico.

8. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos e analisados, concluímos que, dependendo do meio em que a NP é diluída, suas propriedades são alteradas, podendo haver aglomerações ou dispersão. O soro sanguíneo humano altera as características da NP, tornando-a monodispersa, maior e com o potencial zeta menos negativo. Esses parâmetros são dependentes de fatores como o tempo de incubação e a temperatura, por exemplo. Essas alterações podem ser explicadas devido a formação da coroa proteica. A coroa proteica com já discutido, é única para cada nanomaterial. Identificamos que as proteínas adsorvidas na superfície de $\text{MgO}-\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ são proteínas que em sua maioria promovem opsonização, fagocitose e endocitose em células do sistema imune. NPs sem soro sanguíneo humano (sem coroa proteica), são instáveis, precipitam, formam grandes aglomerados e encobrem a membrana celular promovendo morte da célula de forma mais acentuada. Nossos resultados sugerem que, apesar da nanopartícula de $\text{MgO}-\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ ser promissora para diversos tratamentos (antitumoral, por exemplo), é necessário elucidar todos os parâmetros e mecanismos ao qual está submetida, principalmente no que diz respeito a imunotoxicidade haja vista que, entre os vários tipos de células, a interação de NPs com macrófagos é de interesse significativo por causa de seu papel crucial na eliminação do NP da corrente sanguínea.

9. PERSPECTIVAS

Compreender as interações entre nanopartículas e proteínas é uma questão imprescindível no desenvolvimento da entrega de nanomateriais direcionados. É de extrema importância dar continuidade aos estudos de caracterização da nanopartícula de $\text{MgO}-\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$, uma vez que, esse nanomaterial tem apresentado resultados promissores no campo da biomedicina. Porém, ainda precisamos elucidar muitos parâmetros químicos, físicos e

biológicos desse nanomaterial, principalmente no tocante a identidade biológica. Tomando em conjunto os resultados obtidos, é necessário que estudos posteriores possam:

- Avaliar as vias de internalização envolvidas no processo de endocitose em células do sistema imune;
- O tipo de morte celular e,
- Ensaio de biodistribuição *in vivo*;
- Além do mais, aponta para a possibilidade de se fazer funcionalização das NPs para melhorar a biocinética e direcionamento de tratamento. O controle adequado da funcionalidade superficial de nanopartículas pode ditar as interações desejadas de NPs com células, maximizando suas eficiências terapêuticas (SAHA, *et al.*, 2016).
- Outra possibilidade que pode ser investigada é o tratamento de doenças que parasitam células do sistema imune, como por exemplo a leishmaniose visceral, pois assim utilizaria essa propriedade do complexo NP/CP.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.
- ABRAMS, M. J.; MURRER, B. A. Metal compounds in therapy and diagnosis. **Science-New York Then Washington**, v. 261, p. 725-725, 1993.
- ADKINS, J. N., VARNUM, S. M., AUBERRY, K. J., MOORE, R. J., ANGELL, N. H., SMITH, R. D. & POUNDS, J. G. Toward a human blood serum proteome analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 12, p. 947-955, 2002.
- BARRÁN-BERDÓN, A. L., POZZI, D., CARACCILO, G., CAPRIOTTI, A. L., CARUSO, G., CAVALIERE, C., LAGANÀ, A. Time evolution of nanoparticle–protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery. **Langmuir**, v. 29, n. 21, p. 6485-6494, 2013.
- BEAR, J. L., GRAY JR, H. B., RAINEN, L., CHANG, I. M., HOWARD, R., SERIO, G., & KIMBALL, A. P. Interaction of Rhodium (II) carboxylates with molecules of biologic importance. **Cancer chemotherapy reports**, v. 59, n. 3, p. 611-620, 1974.
- BEAR, John L.; KITCHENS, Judith; WILLCOTT III, M. Robert. A kinetic study of the reaction of rhodium (II) acetate with trifluoroacetic acid. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 3479-3486, 1971.
- BEDÊ, P. M. "Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica". 2010, 73f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Militar de Engenharia. 2010.
- BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R198, 2003.
- BRAUN, N. J., DEBROSSE, M. C., HUSSAIN, S. M., & COMFORT, K. K. Modification of the protein corona–nanoparticle complex by physiological factors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 64, p. 34-42, 2016.
- BREUNIG, M; BAUER, S.; GÖPFERICH, A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting?. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 112-128, 2008.
- BULTE, J. W.M; KRAITCHMAN, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. **NMR in Biomedicine**, v. 17, n. 7, p. 484-499, 2004.
- CARACCILO, G.; FAROKHZAD, O. C.; MAHMOUDI, M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. **Trends in Biotechnology**, 2016.
- CARNEIRO, M. L. B. **Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo**. 2011. 130f. Tese de Doutorado. (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- CARNEIRO, M. L. B., NUNES, E. S. R., PEIXOTO C. A. R., OLIVEIRA, G. S., LOURENÇO, L. H. M., SILVA, I. C. R., SIMIONI, A. R., TEDESCO, A. C., SOUZA, A.

- R., LACAVA, Z. G. M. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 11, 2011.
- CARNEIRO, M. L. B., LOPES, C. A. P., MIRANDA-VILELA, A. L., JOANITINI, G. A., DA SILVA, I. C., MORTARI, M. R., SOUZA, A. R., BÁO, S. N. Acute and subchronic toxicity of the antitumor agent rhodium (II) citrate in Balb/c mice after intraperitoneal administration. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1086-1100, 2015.
- CARNEIRO, M. L. B., PEIXOTO, R. C. A., JOANITINI, G. A., SIMÕES, O. R. G., TELLES, L. A. M., MIRANDA-VILELA, A. L., BOCCA, A. L., VIANNA, L. S., RODRIGUES, S. I. C., SOUZA, A. R., LACAVA, Z. G. M., BÁO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, p. 4, 2013.
- CASALS, E., PFALLER, T., DUSCHL, A., OOSTINGH, G. J., & PUNTES, V. F. Hardening of the nanoparticle–protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe₃O₄, CoO, and CeO₂) nanoparticles. **Small**, v. 7, n. 24, p. 3479-3486, 2011.
- CASALS, E., PFALLER, T., DUSCHL, A., OOSTINGH, G. J., & PUNTES, V. Time evolution of the nanoparticle protein corona. **ACS nano**, v. 4, n. 7, p. 3623-3632, 2010.
- CEDERVALL, T., LYNCH, I., FOY, M., BERGGÅRD, T., DONNELLY, S. C., CAGNEY, G. & DAWSON, K. A. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 30, p. 5754-5756, 2007a.
- CEDERVALL, T., LYNCH, I., LINDMAN, S., BERGGÅRD, T., THULIN, E., NILSSON, H., & LINSE, S. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2050-2055, 2007b.
- CHAVES, N. L. Estudo da interação entre nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio e células de câncer de mama. 2017.
- CHAVES, N. L. **Estudo de morte celular em células MCF-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita**. 2013. 66 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- CHAVES, N. L., ESTRELA-LOPIS, I., BÖTTNER, J., LOPES, C. A., GUIDO, B. C., DE SOUSA, A. R., & BÁO, S. N. Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 5511, 2017.
- CHAVES, N. L., LOPES, C. A. P., CARNEIRO, M. L. B., SOUZA, A. R., SILVA, M. O. CORRÊA, J. R., BÁO, S. N. Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal Nanomed Nanotechnol**, v. 6, n. 312, p. 2, 2015.
- CHELLAT, F., MERHI, Y., MOREAU, A., & YAHIA, L. H. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7260-7275, 2005.

- CONESA, A., GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J. M., TEROL, J., TALÓN, M., & ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- CONESA, A; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International journal of plant genomics**, v. 2008, 2008.
- DE SOUZA, A. R., NAJJAR, R., GLIKMANAS, S., & ZYNGIER, S. B. Water-soluble rhodium (II) carboxylate adducts: cytotoxicity of the new compounds. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 1-5, 1996.
- DE, M.; GHOSH, P. S.; ROTELLO, V. M. Applications of nanoparticles in biology. **Advanced Materials**, v. 20, n. 22, p. 4225-4241, 2008.
- DREADEN, E. C., MACKEY, M. A., HUANG, X., KANG, B., & EL-SAYED, M. A. Beating cancer in multiple ways using nanogold. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3391-3404, 2011.
- DRUMMOND, A. L., FEITOZA, N. C., DUARTE, G. C., SALES, M. J. A., SILVA, L. P., CHAKER, J. A. & SOUSA, M. H. Reducing size-dispersion in one-pot aqueous synthesis of maghemite nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 12, n. 10, p. 8061-8066, 2012.
- ERCK, A., RAINEN, L., WHILEYMAN, J., CHANG, I. M., KIMBALL, A. P., & BEAR, J. Studies of Rhodium (II) Carboxylates as Potential Antitumor Agents 1. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 145, n. 4, p. 1278-1283, 1974.
- ESCAMILLA-RIVERA, V., URIBE-RAMIREZ, M., GONZÁLEZ-POZOS, S., LOZANO, O., LUCAS, S., & DE VIZCAYA-RUIZ, A. Protein corona acts as a protective shield against Fe₃O₄-PEG inflammation and ROS-induced toxicity in human macrophages. **Toxicology letters**, v. 240, n. 1, p. 172-184, 2016.
- FERREIRA, L. A. B., RADAIC, A., PUGLIESE, G. O., VALENTINI, M. B., OLIVEIRA, M. R., & DE JESUS, M. B. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149-166, 2014.
- FERREIRA, L. A. B. Citotoxicidade, endocitose e processamento celular de nanopartículas biossintéticas de prata em macrófagos peritoneais. 2015.
- FLEISCHER, C. C., PAYNE, C. K. Nanoparticle–cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. **Accounts of chemical research**, v. 47, n. 8, p. 2651-2659, 2014.
- FLEISCHER, C. C.; KUMAR, U.; PAYNE, C. K. Cellular binding of anionic nanoparticles is inhibited by serum proteins independent of nanoparticle composition. **Biomaterials science**, v. 1, n. 9, p. 975-982, 2013.
- FLEISCHER, C. C.; PAYNE, C. K. Nanoparticle surface charge mediates the cellular receptors used by protein–nanoparticle complexes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 30, p. 8901-8907, 2012.
- FONTANIVE, V. C. P., KHALIL, N. M., COTICA, L. F., & MAINARDES, R. M. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Rev. ciênc. farm. básica apl**, v. 35, n. 4, 2015.

- FONTANIVE, V. C. P., KHALIL, N. M., COTICA, L. F., MAINARDES, R. M. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 549-558, 2014.
- FOROOZANDEH, P. & AZIZ, A. A. Merging worlds of nanomaterials and biological environment: factors governing protein corona formation on nanoparticles and its biological consequences. **Nanoscale research letters**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2015.
- GILJOHANN, D. A.; SEFEROS, D. S.; DANIEL, W. L.; MASSICH, M. D., PATEL, P. C., & MIRKIN, C. A. Gold nanoparticles for biology and medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 19, p. 3280-3294, 2010.
- GÖPPERT, T. M.; MÜLLER, R. H. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns. **Journal of drug targeting**, v. 13, n. 3, p. 179-187, 2005.
- GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J. M., TEROL, J., WILLIAMS, T. D., NAGARAJ, S. H., NUEDA, M. J., & CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, 2008.
- GUO, Z.; SADLER, P. J. Medicinal inorganic chemistry. **Advances in inorganic chemistry**, v. 49, p. 183-306, 1999.
- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
- HAMMOND, C. The Basic of Crystallography and Diffraction. Oxford University Press, New York, 1997.
- HANSSON, G. K. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. s1, p. 328-331, 2009.
- HIRSCH, L., STAFFORD, R. J., BANKSON, J. A., SERSHEN, S. R., RIVERA, B., PRICE, R. E., & WEST, J. L. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13549-13554, 2003.
- HOWARD, R. A., SHERWOOD, E., ERCK, A., KIMBALL, A. P., & BEAR, J. L. Hydrophobicity of several rhodium (II) carboxylates correlated with their biologic activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 20, n. 7, p. 943-946, 1977.
- HUNTER, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. Academic press, London, 2013.
- HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of immunological methods**, v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.
- IMAI, B. S.; MISCHÉ, S. M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. **Electrophoresis**, v. 20, p. 601-605, 1999.

- KARMALI, PRIYA PRAKASH; SIMBERG, DMITRI. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 3, p. 343-357, 2011.
- KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 3, p. 297-308, 2002.
- KLUG, H, P & ALEXANDER, L, E. X-rays Diffraction Procedures. J. Wiley & Sons, New York, 1962.
- KOHANE, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 203-209, 2007.
- LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LIMA, D. A. **Quantificação de Fases Cristalinas de Incrustações em Colunas de Produção de Petróleo pelo Método Rietveld**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.
- LIU, W., ROSE, J., PLANTEVIN, S., AUFFAN, M., BOTTERO, J. Y., VIDAUD, C. Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona? **Nanoscale**, v. 5, n. 4, p. 1658-1668, 2013.
- LOHSE, S. E. & MURPHY, C. J. Applications of colloidal inorganic nanoparticles: from medicine to energy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 38, p. 15607-15620, 2012.
- LORD, C. J. & ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287-294, 2012.
- LÜCK, M., PAULKE, B. R., SCHRÖDER, W., BLUNK, T., & MÜLLER, R. H. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. **Journal of biomedical materials research**, v. 39, n. 3, p. 478-485, 1998.
- LUNDQVIST, M., STIGLER, J., ELIA, G., LYNCH, I., CEDERVALL, T., & DAWSON, K. A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14265-14270, 2008.
- LYKLEMA, J. Fundamentals of interface and colloid science. **Kolloidnyi Zhurnal**, v. 56, n. 2, p. 303-398, 1994.
- MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., & SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, 2002.
- MILANI, S., BALDELLI BOMBELLI, F., PITEK, A. S., DAWSON, K. A., & RÄDLER, J. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona. **ACS nano**, v. 6, n. 3, p. 2532-2541, 2012.

MONOPOLI, M. P., ÅBERG, C., SALVATI, A., & DAWSON, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature nanotechnology**, v. 7, n. 12, p. 779-786, 2012.

MONOPOLI, M. P., WALCZYK, D., CAMPBELL, A., ELIA, G., LYNCH, I., BALDELLI BOMBELLI, F., & DAWSON, K. A. Physical– chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 8, p. 2525-2534, 2011.

MUHAMMAD, N; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current opinion in chemical biology**, v. 19, p. 144-153, 2014.

NEL, A. E., MÄDLER, L., VELEGOL, D., XIA, T., HOEK, E. M., SOMASUNDARAN, P., & THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NUNES, E. S, CARNEIRO, M. L. B., de OLIVEIRA, R. G. S., BÁO, S. N., & DE SOUZA, A. R. Colloidal stability, surface characterisation and intracellular accumulation of Rhodium (II) citrate coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in breast tumour: a promising platform for cancer therapy. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 6, p. 1-15, 2013.

NUNES, E. S. **Citrato de rodio (II): síntese, caracterização, adsorção em nanopartículas de maguemita e preparação de fluidos magnéticos**. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2010.

O'BRIEN, J.; SHEA, K. J. Tuning the Protein Corona of Hydrogel Nanoparticles: The Synthesis of Abiotic Protein and Peptide Affinity Reagents. **Accounts of chemical research**, 2016.

OLIVEIRA, L. C.A; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Quim Nova**, v. 36, p. 123-130, 2013.

PADMAVATHY, N., VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, p. 035004, 2008.

PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., JONES, S. K., & DOBSON, J. J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R167, 2003.

PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation research**, v. 56, n. 1, p. 45-50, 2007.

PEIXOTO, R. C. A. "**Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama**". 106f. dissertação de mestrado – Universidade de Brasília. 2012.

PEIXOTO, R. C. A., MIRANDA-VILELA, A. L., DE SOUZA FILHO, J., CARNEIRO, M. L. B., OLIVEIRA, R. G., DA SILVA, M. O., BÁO, S. N. Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3325-3336, 2014.

- PIEPER, R., GATLIN, C. L., MAKUSKY, A. J., RUSSO, P. S., SCHATZ, C. R., MILLER, S. S. & ZHAO, M. The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. **Proteomics**, v. 3, n. 7, p. 1345-1364, 2003.
- PRIDGEN, E. M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy. **Nanomedicine**, v. 2, n. 5, p. 669-680, 2007.
- PROTOCOL, A. General. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. **Promega**, USA, 2001.
- RADAIC, A., PUGLIESE, G. O., VALENTINI, M. B., OLIVEIRA, M. R., & DE JESUS, M. B. Endocitose e tráfico intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149-166, 2014.
- RAHMAN, M., LAURENT, S., TAWIL, N., YAHIA, L., & MAHMOUDI, M. **Protein-nanoparticle interactions**. Berlin, Germany:: Springer, 2013.
- REMPEL, G. A., LEGZDINS, P., SMITH, H., WILKINSON, G., & UCKO, D. A. Tetrakis (acetato) dirhodium (II) and similar carboxylato compounds. **Inorganic Syntheses**, v. 13, p. 90-91, 1972.
- RICARDO, S. D.; VAN GOOR, H.; EDDY, A. A. Macrophage diversity in renal injury and repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 11, p. 3522-3530, 2008.
- ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.
- SAHA, K., RAHIMI, M., YAZDANI, M., KIM, S. T., MOYANO, D. F., HOU, S., & ROTELLO, V. M. Regulation of macrophage recognition through the interplay of nanoparticle surface functionality and protein corona. **ACS nano**, v. 10, n. 4, p. 4421-4430, 2016.
- SAKULKHU, U., MAHMOUDI, M., MAURIZI, L., SALAKLANG, J., & HOFMANN, H. Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. **Scientific reports**, v. 4, p. 5020, 2014.
- SCHÄFFLER, M., SEMMLER-BEHNKE, M., SARIOGLU, H., TAKENAKA, S., WENK, A., SCHLEH, C., HAUCK, S. M., JOHNSTON, B. D., KREYLING, W. G. Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 24, n. 26, p. 265103, 2013.
- SHRESTHA, S., JIANG, P., SOUSA, M. H., MORAIS, P. C., MAO, Z., & GAO, C. (2016). Citrate-capped iron oxide nanoparticles impair the osteogenic differentiation potential of rat mesenchymal stem cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 2, p. 245-256, 2016.
- SUNDSTRÖM, C. & NILSSON, K. Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma. **International journal of cancer**, v. 13, n. 6, p. 808-823, 1974.
- TREUEL, L., DOCTER, D., MASKOS, M., STAUBER, R. H. Protein corona—from molecular adsorption to physiological complexity. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 857-873, 2015.

- VROMAN, L., ADAMS, A. L., FISCHER, G. C., & MUNOZ, P. C. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. **Blood**, v. 55, n. 1, p. 156-159, 1980.
- WALCZYK, D., BOMBELLI, F. B., MONOPOLI, M. P., LYNCH, I., & DAWSON, K. A. What the cell “sees” in bionanoscience. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 16, p. 5761-5768, 2010.
- WALKEY, C. D. & CHAN, W. C.W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2780-2799, 2012.
- WALKEY, C. D., OLSEN, J. B., GUO, H., EMILI, A., & CHAN, W. C. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 4, p. 2139-2147, 2012.
- WEIDMANN, A. G.; KOMOR, A. C.; BARTON, J. K. Biological effects of simple changes in functionality on rhodium metalloinsertors. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 371, n. 1995, p. 20120117, 2013.
- WOLFRAM, J., YANG, Y., SHEN, J., MOTEN, A., CHEN, C., SHEN, H., ZHAO, Y. The nano-plasma interface: implications of the protein corona. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 124, p. 17-24, 2014.
- YAN, Y., GAUSE, K. T., KAMPHUIS, M. M., ANG, C. S., O'BRIEN-SIMPSON, N. M., LENZO, J. C., & CARUSO, F. Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. **ACS nano**, v. 7, n. 12, p. 10960-10970, 2013.
- YANG, J., PARK, S. B., YOON, H. G., HUH, Y. M., & HAAM, S. Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International journal of pharmaceutics**, v. 324, n. 2, p. 185-190, 2006.
- YANG, S. T., LIU, Y., WANG, Y. W., & CAO, A. Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein–nanoparticle interactions. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1635-1653, 2013.
- ZHAO, F., ZHAO, Y., LIU, Y., CHANG, X., CHEN, C., & ZHAO, Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. **Small**, v. 7, n. 10, p. 1322-1337, 2011.
- ZHU, Y., YANG, Q., YANG, M., ZHAN, X., LAN, F., HE, J., & WU, Y. Protein corona of magnetic hydroxyapatite scaffold improves cell proliferation via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **ACS nano**, v. 11, n. 4, p. 3690-3704, 2017.

11. ANEXO 01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar do projeto de pesquisa “**Estudo das principais proteínas de soro sanguíneo humano capazes de adsorverem as nanopartículas de Magh-Rh₂(H₂cit)₄**” sob a responsabilidade da pesquisadora Thatiane Lima Sampaio. O projeto propõe um estudo sobre as proteínas humanas capazes de adsorverem as nanopartículas de Maghemita associado ao citrato de ródio (Magh-Rh₂(H₂cit)₄).

O objetivo desta pesquisa é estudar as principais proteínas do soro sanguíneo humano, capazes de adsorverem as nanopartículas Magh-Rh₂(H₂cit)₄.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio da cessão de uma amostra sanguínea. O procedimento será feito por uma equipe biomédica no Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biologia, com todos os cuidados de biossegurança e armazenamento da amostra, dura em média 2 minutos e poderá sentir um pequeno desconforto pela “picada” da agulha.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são: hematoma no local da “picada” da agulha e vertigem durante/após o procedimento. Se você aceitar participar, estará contribuindo para compreensão das propriedades e composição da “proteína corona” das nanopartículas de Maghemita associado ao citrato de ródio (Magh-Rh₂(H₂cit)₄) visto que esses critérios são imprescindíveis para direcionar o entendimento tanto do risco quanto da avaliação do potencial farmacológico de engenharia dessas NPs.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Todas as despesas que você tiver relacionadas diretamente ao projeto de pesquisa (tais como, passagem para o local da pesquisa, alimentação no local da pesquisa ou exames para realização da pesquisa) serão cobertas pelo pesquisador responsável.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, você poderá ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Thatiane Lima Sampaio e/ou Sônia Nair Bão, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília no telefone fixo (61) 3107-3122 e/ou no telefone móvel (61) 99693-6663, disponível inclusive para ligação a cobrar. Também pode entrar em contato através dos emails thati_sampaio@yahoo.com.br ou snbao2009@gmail.com.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

Nome / assinatura

Thatiane Lima Sampaio

Brasília, ____ de _____ de _____.

12. APÊNDICE

01- Resumo expandido apresentado no 26º Congresso Brasileiro de Microscopia –

SBMM (Armação dos Búzios – Rio de Janeiro/Brasil)

Nanoparticles Characterization de Magh-Rh₂(H₂cit)₄

Weskly Feitosa Lago^{1*}, Marcelo Henrique Sousa², Sônia Nair Bão³

¹Mestranda em Nanociência e Nanobiotecnologia, UnB-Brasília. Email: weskly20@hotmail.com.

²Faculdade de Ceilândia, UnB-Brasília.

³Depto. Biologia Celular, Instituto Ciências Biológicas, UnB. E.mail: snbao@unb.br.

The magnetic nanoparticles (NPs) allow the drug incorporation that can be directed to their place of action through a magnetic field. When coated with rhodium (II) citrate compound [Rh₂(H₂cit)₄], they reduce the side effects of the drug; besides, they are cytotoxic to tumor cells [1]. To understand the physicochemical properties or synthetic identity of NP (size, shape, load, pH, among others), has a crucial importance, mainly, when it comes to study in a biological environment. This work proposes the characterization of NPs of Magh-Rh₂(H₂cit)₄ will be used, subsequently, to study about protein corona. The proposed synthesis route was previously described [2]. To prepare the fluid, the amount of the rhodium (II) citrate solution was added to 0.788 mL of precursor acid fluid (γ-Fe₂O₃). The sample volume was measured to 10 mL and pH adjusted to 7 with diluted NaOH solution. There was peptized magnetic nanoparticles and stable solution formation. The sample was measured by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) and the final maghemite concentration was 38.07 mmol/L and rhodium (II) citrate was 0.37 mmol/L. To characterize the distribution of diameter and surface charge of NPs, the Zetasizer Nano ZS (Malvern) equipment was used. The morphological characterization and measurement were obtained from the MET (Electronic Microscopy of Transmission), MEV (Scanning Electronic Microscope) and by the technique of DRX (Diffraction of X-Rays). The NPs show midsize hydrodynamic diameter 147,2±2,962, Zeta Potential of surface, ZP -40 mV, with monodisperse characteristic with PDI (Polydispersity Index) 0,173±0,014. Figure 1 (A) shows a sample micrograph Magh-Rh₂(H₂cit)₄, obtained in microscope of transmission JEOL sample JEM 2010. The NPs perceived are approximately spherical and have polydispersity in size. Those characteristics were described in other works [1,2]. The distribution deduction in size for the samples were made, calculating the perimeter of 250 particles. The figure 1 (B) presents the histogram of size corresponding to the particles displayed in micrograph. The mode value was 9 nm and average 9.79 nm±1.707. Figure 2 (A) shows the X-ray diffraction spectrum. In the case of the measured samples, the structure spinel cubic type is confirmed [3] (Figure 2 B). The midsize diameter found in dRX was 9.75 nm which corroborates with the result found in the MET measurement. Figure 3 (A) shows the morphology of agglomerates Magh-Rh₂(H₂cit)₄ NPs analyzed in SEM. When performing Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) (Figure 03 - B and C), the chemical elemental composition of the sample under analysis was obtained. Carbon, Oxygen and Iron elements were detected at the two points chosen in the image. Through the characterization carried out, it is concluded that Magh-Rh₂(H₂cit)₄ sample has stable characteristics and can be used for further biological studies, such as the study of protein corona and cell viability.

Acknowledgment: CAPES, CNPq, FAPDF and FINEP.

References:

- [1] Chaves N.L et al. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 6.5 (2015): 1.
- [2] Nunes E.S et al. *Journal of nanoparticle research* 15.6 (2013): 1683.
- [3] Oliveira L.C.A, Fabris J.D & Pereira M.C. *Quim Nova* 36 (2013): 123-130.

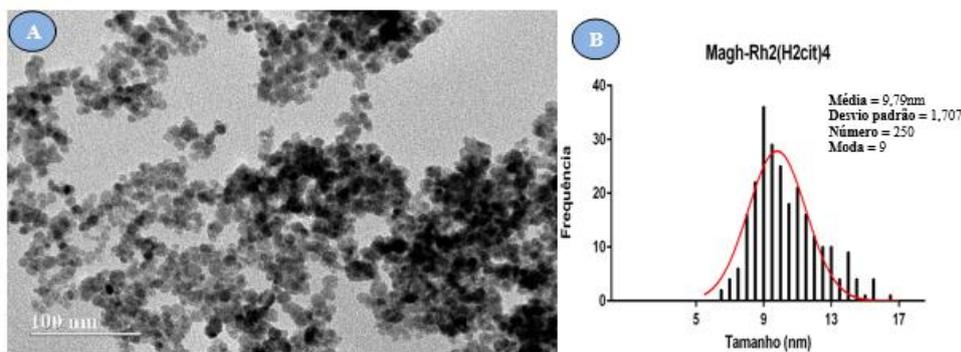


Figure 01 - Morphological characterization and measurement of maghemite nanoparticles by transmission electron microscopy. (A) Micrograph of magnetite nanoparticles coated with rhodium (II) citrate ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$). (B) Histogram of diameters distribution of $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$. Medium size: $9.79 \text{ nm} \pm 1.707$; Number: 250; mode: 9 nm (*GraphPad Prism 6.0*).

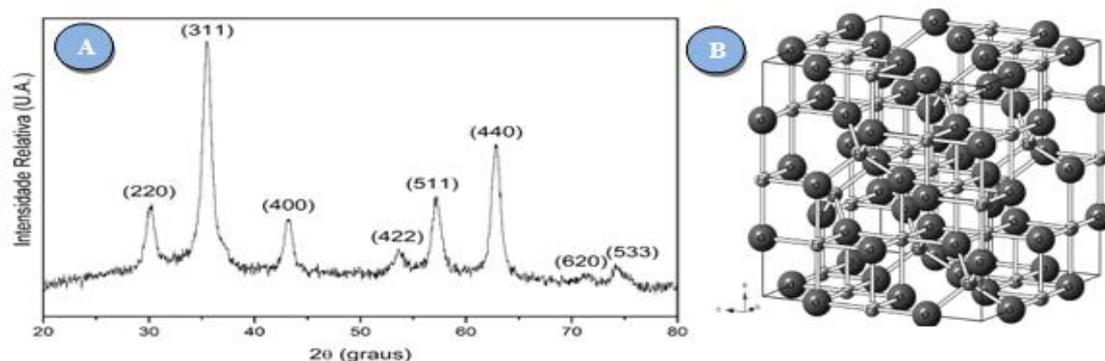


Figure 2 - X-rays Diffractogram of $\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ compound (A). Crystal structure of Maghemite (B) [3].

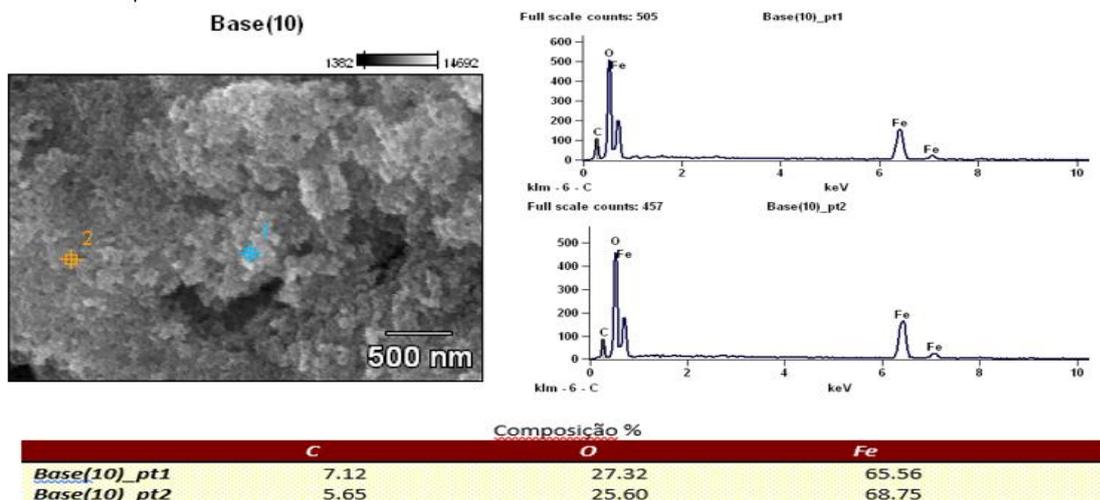


Figure 03 - Morphological characterization and composition of maghemite nanoparticles by Scanning Electron Microscopy. (A) Electronic micrograph of magnetite nanoparticles coated with rhodium (II) citrate ($\text{Magh-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$). (B) Graphic of sample composition by EDS/EDX. (C) Values as a percentage of composition elements detected in the two points marked on the micrograph (pt1 and pt2).



ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA EM NANOPARTÍCULAS DE MAGH-RH₂(H₂CIT)₄ APÓS INCUBAÇÃO COM SORO SANGUÍNEO HUMANO

Weskly Feitosa Lago (1), Marcelo Henrique Sousa (2), Marina Arantes Radicchi (3),
Guilherme Augusto C. G Sá (4), Sônia Nair Bão (5)

(1) Mestranda em Nanociência e Nanobiotecnologia, Depto. Biologia Celular, Instituto Ciências Biológicas, UnB-Brasília/Brasil. (2) Faculdade de Ceilândia, UnB-Brasília. (3) Mestranda em Biologia Animal, Depto. Genética e Morfologia, Instituto Ciências Biológicas, UnB-Brasília/Brasil. (4) Graduando em Ciências Ambientais, Depto. Ciências Ambientais, UnB – Brasília/Brasil. (5) Depto. Biologia Celular, Instituto Ciências Biológicas, UnB-Brasília/Brasil.
Email: weskly20@hotmail.com.

Nanopartículas (NPs) são cada vez mais importantes para aplicações biológicas principalmente no que diz respeito à entrega de drogas. Estudos revelam que as NPs ao terem contato direto com fluidos biológicos (sangue, por exemplo) interagem com várias biomoléculas, em especial as proteínas que recobrem imediatamente com concentrações elevadas (60-80 g/L) formando uma “coroa proteica” (CP), produzindo a sua chamada “identidade biológica” [1]. Embora os fluidos biológicos contenham uma grande variedade de proteínas, a composição da CP é única para cada nanomaterial e é influenciada por vários parâmetros tais como: as propriedades físico-químicas da nanopartícula e características do ambiente” [2]. As propriedades físico-químicas ou identidade sintética da NP (tamanho, forma, carga, pH, dentre outros), influencia bastante sobre os tipos e a quantidade de proteínas que constituem a coroa. O complexo NP-CP, é dinâmico por natureza e depende também de fatores como ambiente local, temperatura, concentração e o tipo de plasma/soro, tempo de incubação, dentre outros fatores [3]. Sendo assim, a coroa pode variar, principalmente a coroa mole que interage com o meio circundante. Nessa linha, esse trabalho tem como objetivo avaliar as alterações de carga, diâmetro e pH após a formação da “coroa proteica” em nanopartículas de Maghemita associada ao citrato de ródio (Magh-Rh₂(H₂cit)₄), incubadas com soro sanguíneo humano no decorrer do tempo e com diferentes temperaturas. A caracterização das nanopartículas quanto a morfologia e tamanho, foi realizada por MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão) e pela técnica de DRX (Difração de Raio X). O valor obtido para média de tamanho no MET foi de 9,79 nm ± 1,707 e moda 9 nm (figura 01, A e B). O valor de DRX foi 9,75 nm e confirmou a estrutura do tipo espinélio. Para a caracterização quanto à distribuição de diâmetro e de carga superficial das nanopartículas, foi utilizado o aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern). O ensaio foi realizado na temperatura de 25°C e 37°C. As amostras foram medidas e diluídas (NP pura: diluída em água ultrapura; NP incubada com soro: diluída em PBS) nos intervalos de tempo de: 0h, 12h e 24h. As medições do Índice de Polidispersão (PDI) mostraram picos cada vez mais monodispersas, com exceção da amostra incubada com soro na temperatura de 25°C que mostrou uma elevação no pico no decorrer das horas. Nossos resultados sugerem que proteínas estabilizam a dispersão da NP em estudo, impedindo-os de aglomerações, mas que é dependente da temperatura (Figura 02, A). Foi detectado um aumento no Diâmetro Hidrodinâmico (HD) das NPs após a incubação com o soro. De 149,7 nm aumentou para 158,0 nm. Notou-se uma diferença de diâmetro em decorrência da temperatura. As amostras submetidas à temperatura de 25°C teve um aumento maior no decorrer do tempo. Com 24 horas de incubação, as NPs à 25°C estavam com 208,3 nm e as NPs à 37°C com 174,7 nm de tamanho (Figura 02, B). A formação da coroa proteica diminui a carga negativa da superfície das NPs. Antes da incubação, as NPs demonstraram uma carga superficial negativa de -43 mV, com uma pequena variação na amostra submetida a 37°C. Após a incubação, a carga superficial negativa diminuiu (-12,7 mV) e não houve variações relevantes no decorrer do tempo e nem dependente da temperatura (Figura 02, C). Estes valores indicam uma conjugação de proteínas de soro com a superfície das Nps reduzindo a sua energia

livre e realizando um efeito neutralizante. O pH também foi alterado após a incubação. De 6,69 passou para 8,05, sendo percebido uma ligeira neutralização no decorrer do tempo (Figura 02, D). Schaffer e colaboradores [3] obtiveram resultados semelhantes em NPs de ouro. Nossos resultados sugerem que há formação da coroa proteica em NPs de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ incubadas com soro sanguíneo humano, como demonstrado pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico e pela diminuição do potencial negativo da superfície das NPs. Além disso, o tempo de incubação e a temperatura influencia na interação de NP/PC. As proteínas adsorvidas nas NPs serão identificadas a *posteriori*.

Agradecimentos: CAPES, CNPq, FAPDF e FINEP.

Referências Bibliográficas:

- [1] O'BRIEN, J.; SHEA, K. J. *Accounts of chemical research*, 2016.
 [2] YANG, S. T. et al. *Small*, v. 9, n. 9-10, p. 1635-1653, 2013.
 [3] SCHÄFFLER, M. et al. *Nanotechnology*, v. 24, n. 26, p. 265103, 2013.

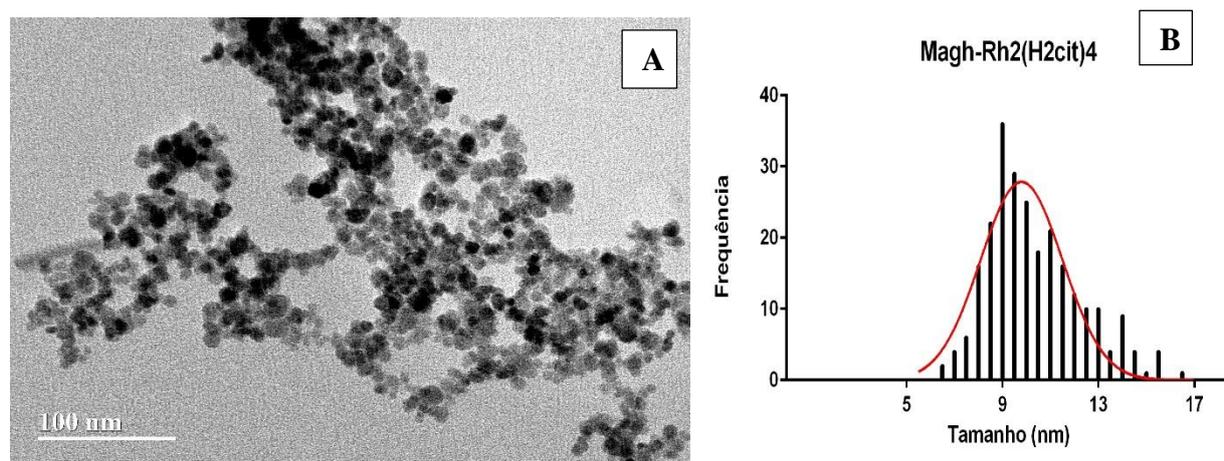


Figura 01 - Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de maghemita por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Micrografia de nanopartículas de maghemita associadas com citrato de ródio (II) (Magh-Rh₂(H₂cit)₄). **(B)** Histograma da distribuição dos diâmetros de Magh-Rh₂(H₂cit)₄. Média: 9,79 nm ± 1,707; Número: 250; Moda: 9 nm (*GraphPad Prism 6.0*).

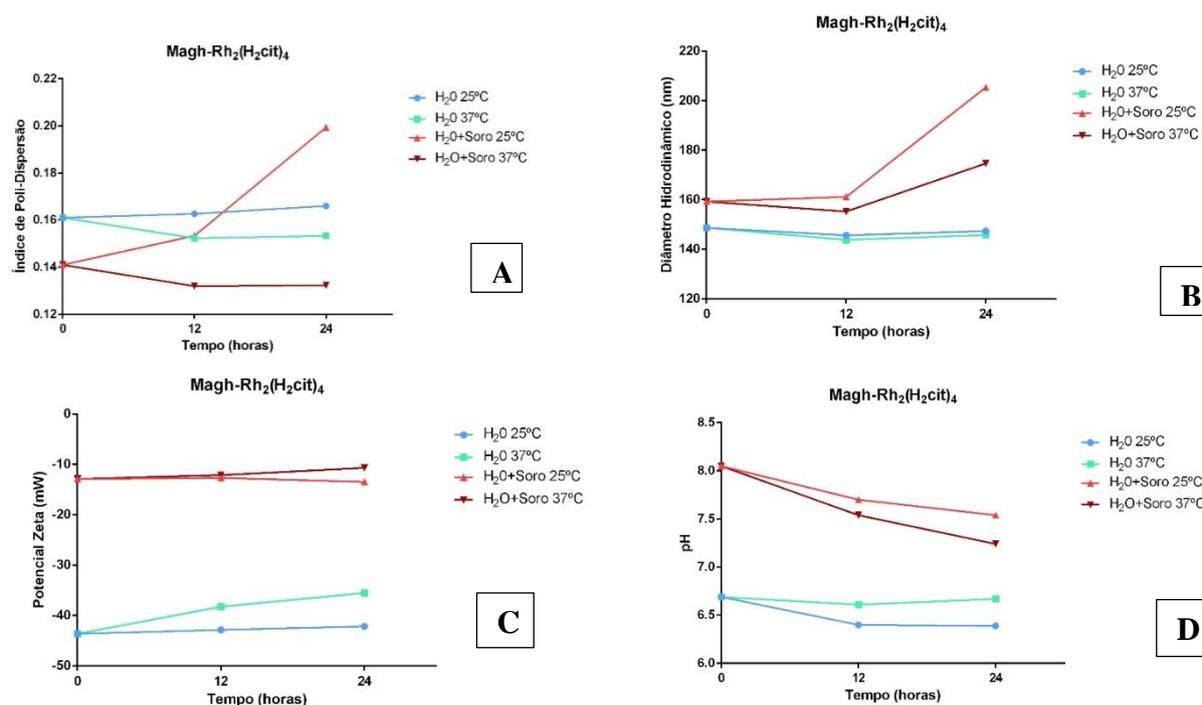


Figura 02 – Análise físico/química do composto de Magh-Rh₂(H₂cit)₄ com adição de soro humano, no decorrer do tempo (0H, 12H e 24H) em diferentes temperatura (25°C e 37°C). (A) Índice de polidispersão. **(B)** Diâmetro Hidrodinâmico. **(C)** Potencial Zeta. **(D)** pH. (*GraphPad Prism 6.0*).