



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS
DOUTORADO

CINTHIA CARDOSO MOREIRA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FLUORURACIL
ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER COLORRETAL DO TIPO
ADENOCARCINOMA

CRICIÚMA, MARÇO DE 2025

CINTHIA CARDOSO MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FLUORURACIL
ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER COLORRETAL DO TIPO
ADENOCARCINOMA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila.

CRICIÚMA, MARÇO DE 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M838a Moreira, Cinthia Cardoso.

Avaliação da citotoxicidade do fluoruracil associado a nanopartículas de ouro em linhagem celular de câncer colorretal do tipo adenocarcinoma / Cinthia Cardoso Moreira. - 2025. 55 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico.
2. Fluoruracila - Efeitos colaterais. 3.
Neoplasias colorretais - Tratamento. 4.
Neoplasias malignas - Tratamento. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER

No dia 21 (vinte e um) do mês de março de 2025, às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos, na Sala 108/Bloco R1, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FLUORURACIL ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER COLORRETAL DO TIPO ADENOCARCINOMA**”, da candidata **Cinthia Cardoso Moreira**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Alexandra Ioppi Zugno** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Cristiane Damiani Tomasi** (Membro Externo – UNESC) e **Dra. Clara Guerra Duarte** (Membro Externo – FUNED). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

Trabalho não aprovado

Observações:

Criciúma, SC, 21 de março de 2025.

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo – UNESC

Profa. Dra. CLARA GUERRA DUARTE
Membro Externo – FUNED

Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA
Orientador(a)

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Coordenadora Titular do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. No Brasil, a neoplasia de intestino ocupa o terceiro lugar em ambos os sexos. Atualmente, milhões de pessoas com câncer conseguem prolongar suas vidas devido ao diagnóstico precoce e rápido início do tratamento, o qual envolve cirurgia, radioterapia, quimioterapia e/ou hormonioterapia. Entretanto, mesmo atingindo resultados satisfatórios em muitos casos, estas opções terapêuticas podem levar danos as células e aos tecidos que não estão doentes, causando toxicidade e efeitos colaterais aos indivíduos submetidos a esses tipos de tratamentos. Um dos fármacos mais utilizados para o tratamento do câncer intestinal é o 5-Fluorouracil (5-FU), cujos eventos adversos mais comumente encontrados são as alterações gastrointestinais e hematológicas, que muitas vezes limitam seu uso nos pacientes. Por outro lado, vários estudos recentes demonstram o papel das nanotecnologias, em especial das nanopartículas de ouro (NPAu), como ferramentas promissoras no tratamento de neoplasias malignas, sendo utilizada como carreadoras de fármacos devido a suas propriedades de ressonância plasmônica de superfície, capacidade de fluorescência e biocompatibilidade. Todas estas características fazem com que estas partículas possuam notáveis benefícios, oferecendo muitas possibilidades para serem exploradas como agentes terapêuticos e diagnósticos na oncologia. Somados a isto, a natureza não tóxica e não imunogênica das NPAu, a alta permeabilidade e o efeito de retenção, proporcionam benefícios adicionais que permitem facilmente a penetração e o acúmulo seletivo de agentes terapêuticos no microambiente tumoral. Essas características abrem possibilidades para melhorar a especificidade e a eficácia dos tratamentos, reduzindo os danos colaterais aos tecidos saudáveis. Diante disso, a presente tese teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos da associação do 5-FU às NPAu em células da linhagem Caco-2, derivadas de adenocarcinoma colorretal. Foram analisadas a atividade hemolítica pelo ensaio de hemólise, a citotoxicidade dos tratamentos e associações, pelo ensaio viabilidade celular, e os níveis de danos ao DNA induzidos pela associação entre 5-FU e NPAu pelo ensaio cometa. Para isso, foram utilizadas células tumorais Caco-2 e células normais NIH/3T3 (fibroblastos de camundongo). As células foram expostas a diferentes concentrações de 5-FU, NPAu, e à combinação de ambos, por períodos de 24 e 48 horas. Os resultados obtidos demonstraram a síntese bem-sucedida das NPAu, confirmada pela espectrofotometria UV-Vis. A análise do potencial zeta revelou que a associação com o 5-FU alterou significativamente a carga superficial das NPAu, sugerindo a formação de uma camada do fármaco sobre as nanopartículas, o que pode influenciar sua estabilidade coloidal e comportamento biológico. Além disso, a análise do índice de polidispersão (IPd) mostrou que a adição do 5-FU resultou em um aumento no diâmetro hidrodinâmico das NPAu, indicando a formação de uma estrutura mais estável em função da concentração do fármaco. No ensaio de viabilidade celular, o 5-FU associado a NPAu potencializou o efeito antineoplásico em células tumorais em concentrações mais baixas do fármaco, sendo provavelmente possível assim reduzir sua citotoxicidade em células normais. Além disso, a análise de danos ao DNA, por meio do ensaio cometa, revelou que a associação entre NPAu e 5-FU reduziu os níveis de danos genotóxicos quando comparada ao 5-FU isolado, sugerindo um efeito protetor das NPAu. Estes achados indicam que as NPAu funcionalizadas com 5-FU apresentam estabilidade coloidal aprimorada, baixa citotoxicidade inicial e potencial para minimizar efeitos adversos do fármaco convencional, destacando seu potencial para aplicações terapêuticas futuras.

Palavras-chaves: neoplasias malignas; câncer colorretal; 5-fluorouracil; nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide. In Brazil, intestinal neoplasia ranks third in both sexes. Currently, millions of cancer patients can prolong their lives due to early diagnosis and the rapid initiation of treatment, which includes surgery, radiotherapy, chemotherapy, and/or hormone therapy. However, despite achieving satisfactory results in many cases, these therapeutic options can damage healthy cells and tissues, leading to toxicity and side effects in individuals undergoing such treatments. One of the most commonly used drugs for treating intestinal cancer is 5-Fluorouracil (5-FU), whose most frequent adverse events include gastrointestinal and hematological alterations, often limiting its use in patients. On the other hand, several recent studies highlight the role of nanotechnologies, particularly gold nanoparticles (AuNPs), as promising tools in the treatment of malignant neoplasms, mainly as drug carriers due to their surface plasmon resonance properties, fluorescence capacity, and biocompatibility. These characteristics provide remarkable benefits, offering numerous possibilities for exploration as therapeutic and diagnostic agents in oncology. Additionally, the non-toxic and non-immunogenic nature of AuNPs, along with their high permeability and enhanced retention effect, provides additional advantages that allow for easy penetration and selective accumulation of therapeutic agents in the tumor microenvironment. These properties open avenues for improving the specificity and efficacy of treatments while reducing collateral damage to healthy tissues. Given this, the present thesis aimed to evaluate the cytotoxic effects of the association between 5-FU and AuNPs in Caco-2 cells, derived from colorectal adenocarcinoma. Hemolytic activity was assessed through the hemolysis assay, cytotoxicity of the treatments and their combinations was evaluated via the cell viability assay, and the levels of DNA damage induced by the association between 5-FU and AuNPs were analyzed using the comet assay. For this purpose, Caco-2 tumor cells and NIH/3T3 normal cells (mouse fibroblasts) were used. The cells were exposed to different concentrations of 5-FU, AuNPs, and their combination for 24 and 48 hours. The results demonstrated the successful synthesis of AuNPs, confirmed by UV-Vis spectrophotometry. Zeta potential analysis revealed that the association with 5-FU significantly altered the surface charge of AuNPs, suggesting the formation of a drug layer on the nanoparticles, which may influence their colloidal stability and biological behavior. Additionally, polydispersity index (PDI) analysis showed that the addition of 5-FU resulted in an increase in the hydrodynamic diameter of AuNPs, indicating the formation of a more stable structure depending on the drug concentration. In the cell viability assay, the combination of 5-FU with AuNPs enhanced the antineoplastic effect on tumor cells at lower drug concentrations, which could potentially reduce its cytotoxicity in normal cells. Furthermore, DNA damage analysis using the comet assay revealed that the association between AuNPs and 5-FU reduced genotoxic damage levels compared to 5-FU alone, suggesting a protective effect of AuNPs. These findings indicate that 5-FU-functionalized AuNPs exhibit enhanced colloidal stability, low initial cytotoxicity, and potential for minimizing the adverse effects of conventional chemotherapy, highlighting their promise for future therapeutic applications.

Keywords: malignant neoplasms; colorectal cancer; 5-Fluorouracil; golden nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química do uracil e 5-FU.....	12
Figura 2: Mecanismo de ação do 5-fluorouracil	13
Figura 3: Área de superfície das nanopartículas.....	15
Figura 4: Nanocarreadores no tratamento de câncer.....	16
Figura 5: Perfis de potencial zeta (ZP) das nanopartículas de ouro (NPAu) na ausência e presença do fármaco fluorouracil (5-FU)	28
Figura 6: Índice de Polidispersão das nanopartículas de ouro (NPAu) na ausência e presença do fármaco 5-Fluoruracil (5-FU)	29
Figura 7: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de Caco-2 tratadas por 24 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN.....	31
Figura 8: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de NIH/3T3 tratadas por 24 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN.....	31
Figura 9: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de Caco-2 tratadas por 48 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN.....	32
Figura 10: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de NIH/3T3 tratadas por 48 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN.....	33
Figura 11: Efeito do Fluorouracil (5-FU), 5-FU + NPAu e NPAu sobre a morfologia dos eritrócitos.....	34
Figura 12: Avaliação dos danos ao DNA <i>in vitro</i> pelo parâmetro <i>Tail intensity</i> (%) em cultura celular de Caco-2 tratadas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Raio hidrodinâmico (UR), índice de polidispersão (IPd), potencial zeta (ZP) de nanopartículas de ouro (NPAu) livres e NPAu associados a soluções de 50,0 mg/mL de 5-Fluorouracil (5-FU)	30
Tabela 2: Avaliação da hemocompatibilidade do 5-Fluoruracil (5 µg/mL), 5-Fluoruracil + NPAu e NPAu, representado pela taxa de hemólise (%)	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU – 5-Fluorouracil

CCR – Câncer colorretal

DLS – Espalhamento de luz dinâmica

DMEM - Meio modificado por Dulbecco's, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPD - dihidropirimidina desidrogenase

dTMP - desoxitimidina monofosfato

DUMP - desouridina monofosfato

dUTP - 2'-Desoxiuridina, 5'-Trifosfato

ERRO – espécie reativa de oxigênio

FdUMP - fluoro-desoxiuridina monofosfato

FdUTP - trifosfato de 5-fluorodesoxiuridina

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IPd – Índice de polidispersão

MTT - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan

NaCL – Cloreto de sódio

NP - Nanopartículas

NPAu – Nanopartículas de ouro

PEG - polietileno glicol

PLA – Ácido polilático

RNA – Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

TMZ – Temozolamida

TS - timidilato sintase

TNPAu – Temozolamida associada a nanopartículas de ouro

UV - Ultravioleta

UV – Vis - Ultravioleta visível

ZP – Potencial zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CÂNCER COLORRETAL.....	10
1.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	11
1.3 5-FLUOROURACIL.....	12
1.4 USO DE NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER.....	16
1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	18
1.6 JUSTIFICATIVA.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	22
3.2 ASSOCIAÇÃO DO 5-FLUOROURACIL COM AS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	22
3.2.1 Potencial Zeta.....	22
3.2.2 Índice de polidispersão.....	23
3.3 CULTURA CELULAR.....	23
3.3.1 Ensaio De Viabilidade Celular - MTT.....	24
3.4 AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE.....	24
3.5 ENSAIO COMETA <i>in vitro</i>	25
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4 RESULTADOS.....	28
4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	28
4.1.1 Espectrofotometria UV-Vis das nanopartículas de ouro.....	28
4.1.2 Potencial Zeta (ZP).....	28
4.1.3 Índice de Polidispersão (IPd).....	29
4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT.....	31
4.3 AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE.....	34
4.4 ENSAIO COMETA <i>in vitro</i>	35
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias são definidas como tumores que resultam do crescimento desordenado de células causado por danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), que ao não serem reparados pelo organismo, levam ao desenvolvimento de mutações. Estas mutações podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida do indivíduo, devido a exposição a agentes carcinogênicos como substâncias químicas, radiação ionizante ou hábitos prejudiciais (Sudhakar, 2009).

O tumor maligno, também conhecido como câncer, se diferencia da lesão benigna, devido sua capacidade de invadir e espalhar-se para outras partes do organismo através da circulação sanguínea ou linfática, levando a formação de lesões a distância do seu sítio primário, conhecidas como metástases, que se desenvolvem principalmente no sistema nervoso central, ossos, fígado e pulmões (Ministério da Saúde - INCA, 2023).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares. Atualmente, milhões de pessoas com câncer conseguem prolongar suas vidas devido ao diagnóstico precoce e rápido início do tratamento, o qual pode envolver as modalidades de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia (Cappell, 2008; Sudhakar, 2009). Entretanto, mesmo atingindo resultados satisfatórios em muitos casos, estas opções terapêuticas podem causar danos às células e aos tecidos que não estão doentes, causando toxicidade e efeitos colaterais aos indivíduos submetidos a esses tipos de tratamentos (Assis, 2011; Wang et al., 2018).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o tumor maligno mais incidente em ambos os sexos é o câncer de pele do tipo não melanoma, seguido pelos tumores de próstata nos homens e de mama em mulheres. Ocupando o terceiro lugar, tanto no sexo masculino quanto no feminino, está o câncer colorretal (CCR). Em relação à mortalidade, em homens os tumores de pulmão, próstata e intestino são os que mais matam, já em mulheres, temos o câncer de mama em primeiro lugar, seguido de pulmão e intestino, ocupando respectivamente os segundo e terceiros lugares (Ministério da Saúde - INCA, 2023).

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O CCR representa uma das neoplasias malignas de maior incidência e mortalidade, sendo o terceiro tumor maligno mais comum no mundo. Acomete células epiteliais que revestem o lúmen do cólon, e é progressivamente classificado em cinco estágios de evolução

(0, I, II, III e IV) a depender da profundidade de invasão do tumor, do comprometimento de linfonodos e da existência de metástases a distância (Assis, 2011; Cappell, 2008; Khan et al., 2021).

O tipo histológico mais comumente encontrado no CCR, responsável por mais de 90% dos casos, é o adenocarcinoma. Este tipo de tumor tem como fatores de risco já reconhecidos a idade avançada, o sexo masculino, o histórico pessoal ou familiar de câncer de intestino, a presença de pólipos intestinais, os fatores genéticos, sendo eles adquiridos ou hereditários, e alguns fatores ambientais como dieta rica em gordura e pobre em fibras, obesidade, sedentarismo e tabagismo. A prática regular de exercícios físicos aeróbicos, o uso crônico de ácido acetilsalicílico, a dieta rica em fibras, vitamina D, selênio e magnésio são considerados fatores protetores do CCR (Ministério da Saúde - INCA, 2023).

Em relação aos fatores genéticos, acredita-se que os agentes cancerígenos provoquem mutações genéticas específicas no DNA nuclear das células do epitélio intestinal, produzindo mutações, fraturas cromossômicas e outras alterações do material genético. As alterações celulares que resultam da exposição da mucosa intestinal aos agentes cancerígenos inicialmente se manifestam por lesões inflamatórias inespecíficas. Se esta agressão é intensa e prolongada, levará ao desenvolvimento de displasias celulares, e, posteriormente, do carcinoma *in situ*, que progride para o câncer invasivo, se não tratado (Winawer, 1999).

A escolha do tratamento oncológico vai depender da condição clínica do paciente e do estágio de evolução do tumor ao diagnóstico. O tratamento padrão para o câncer de cólon localizado consiste na ressecção cirúrgica por via aberta do tumor primário e o esvaziamento dos linfonodos regionais (Ministério da Saúde - INCA, 2023). Os tratamentos adjuvantes, aqueles iniciados após o tratamento cirúrgico, são utilizados na maioria das vezes para reduzir o risco potencial de metástases, recidiva e morte pelo tumor (Assis, 2011; Cappell, 2008; DeVita et al., 2021). A quimioterapia paliativa está indicada para doentes com CCR recidivado inoperável ou com doença metastática ao diagnóstico (Koukourakis, 2010; Petrelli et al., 2012).

1.2 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

O tratamento de tumores com medicamentos quimioterápicos passou por várias mudanças ao longo dos anos, com a identificação de drogas com potencial curativo para muitas neoplasias malignas anteriormente fatais. A quimioterapia pode prolongar a vida e impedir a recidiva da doença após a ressecção cirúrgica de diversos tumores, permitindo, muitas vezes, a

realização de uma cirurgia mais limitada e até mesmo a cura de casos que antigamente eram incuráveis (Brunton et al., 2019). Todavia, a resistência a fármacos continua sendo um obstáculo ao tratamento do câncer, e resulta de uma variedade de alterações moleculares, cujos mecanismos incluem a absorção e liberação inadequadas do fármaco; a ativação e depuração da droga; e mutações, amplificações ou deleções nos alvos dos fármacos (Van Schaeybroeck et al., 2013). Os defeitos no reconhecimento de quebras do DNA, a hiperexpressão de enzimas de reparos específicas e a perda das vias apoptóticas podem também contribuir para a resistência a agentes citotóxicos (Brunton, 2019).

Os quimioterápicos são compostos citotóxicos que exibem acentuada variação em sua estrutura e no seu mecanismo de ação, e incluem os agentes alquilantes; os análogos antimetabólitos do ácido fólico, das pirimidinas e das purinas; os produtos naturais, hormônios e antagonistas hormonais; e uma variedade de agentes dirigidos para alvos moleculares específicos (Chabner e Roberts, 2005).

Os tratamentos quimioterápicos possuem toxicidade tanto para as células cancerosas como para as células normais. Os efeitos adversos dependem do tipo de apresentação do medicamento e da dose administrada, e podem ser divididos em dois grupos principais: agudos, que se iniciam em minutos após a administração do agente antineoplásico e persistem por alguns dias, e tardios, que aparecem semanas ou meses após a infusão deles (Brunton, 2019; Khan et al., 2021).

No CCR os fármacos a base de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina), 5-fluorouracil (5-FU) e leucovorin são os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento deste tipo de tumor. O mecanismo de ação destes medicamentos, em geral, ocorre através da destruição do DNA das células tumorais, inibindo sua proliferação celular, porém existem várias limitações relacionadas ao uso destes quimioterápicos. Estas incluem resistência, citotoxicidade sistêmica, imunossupressão medular, disfunção celular e falência de órgãos, os quais podem causar inúmeros efeitos colaterais aos pacientes que fazem uso destas drogas, tais como náuseas, vômitos, diarreia, infecção, mucosite, alopecia, neuro e nefrotoxicidade. (Cappell, 2008; DeVita et al., 2021; Khan et al., 2021).

1.3 5-FLUOROURACIL (5-FU)

Os antimetabólitos são um grupo de fármacos com estrutura bioquímica similar a um metabólito necessário para reações normais do organismo, assim o inibindo por competição. Esta similaridade é suficiente para ser reconhecida pelo organismo, mas insuficiente para

manter as funções normais, alterando o metabolismo da célula, incluindo a divisão celular (Rang et al., 2020). Esta classe de medicamentos é dividida em análogos do ácido fólico (metotrexato), análogos da pirimidina (5-FU, capecitabina, citarabina) e análogos da purina (6-mercaptopurina, tioguanina, pentostatina).

O 5-FU foi introduzido na terapêutica de tumores em 1957 e continua até hoje a ser parte essencial do tratamento de uma variedade de tumores, incluindo tumores gástricos, colorretais, de cabeça e pescoço, mama, ovário, próstata, fígado e do trato geniturinário (Malet-Martino, 2002). Inicialmente este fármaco foi utilizado de forma isolada e, posteriormente passou a ser utilizado em diferentes esquemas de combinações, melhorando assim a resposta clínica dos pacientes, com variações em suas doses, apresentações, tempo e tipo de infusão, que pode ser em bólus ou infusões contínuas (Blaschke, 2011).

Quando aprovado, o medicamento foi utilizado para o tratamento de pacientes com câncer de mama e cólon metastáticos, e posteriormente, passou a ser utilizado também nos casos de adjuvância, após o tratamento cirúrgico (Rang et al., 2020). O 5-FU difere da base uracil pela substituição de um átomo de flúor na posição 5 do carbono no anel pirimídico. A estrutura química do uracil e do 5-FU estão representadas na Figura 1.

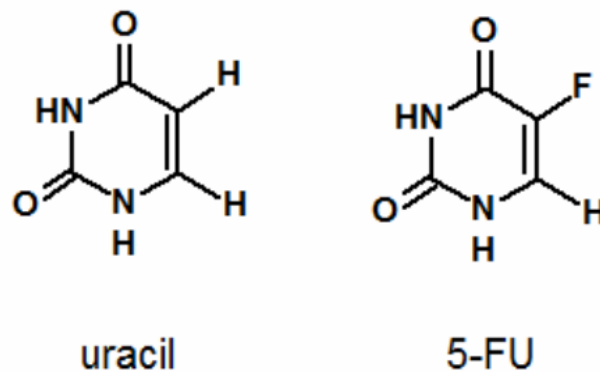


Figura 1: Estrutura química do uracil e 5-FU. Fonte: NCBI, 2024.

Para se tornar ativo o 5-FU precisa ser convertido em seus metabólitos, os quais precisam ser fosforilados para que sejam erroneamente incorporados no DNA e RNA (ácido ribonucleico) ou atuar inibindo a enzima timidilato sintase (TS), responsável pela conversão de desouridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP) com um doador de

metil (5,10-metileno-tetrahidrofolato). A TS é a única fonte de timidilato intracelular na via da síntese de piridinas (Longley et al., 2003).

Após ocorrer a penetração na célula, o 5-FU é metabolizado através de duas vias que concorrem entre si: a via anabólica, que dá origem aos metabólitos ativos, e a via catabólica, que inativa o 5-FU e conduz a eliminação do fármaco. A atividade biológica do 5-FU está associada ao seu metabolismo, devido à formação de seu metabólito ativo 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), o qual inibe a TS, formando um complexo ternário covalente entre a TS e o 5,10 -metileno-tetrahidrofolato, aumentando assim a concentração de dUMP intracelular. A inibição da TS impede assim a síntese de DNA, levando a célula à apoptose. O dUMP e o FdUMP podem ainda ser fosforilados, produzindo respectivamente 2'-Desoxiuridina, 5'-Trifosfato (dUTP) e Trifosfato de 5-fluorodesoxiuridina (FdUTP), os quais podem ser incorporados no DNA e RNA intracelular, interferindo em seu processamento (Nagore et al., 2000; Roque e Forones, 2006; DeVita et al., 2021). A citotoxicidade do 5-FU resulta da interferência do fármaco na replicação do RNA e da depleção da timidina, que segue ligada com a enzima timidilato sintetase (Longley et al., 2003; Brunton et al., 2019). O mecanismo de ação do 5FU encontra-se esquematizado abaixo, na Figura 2.

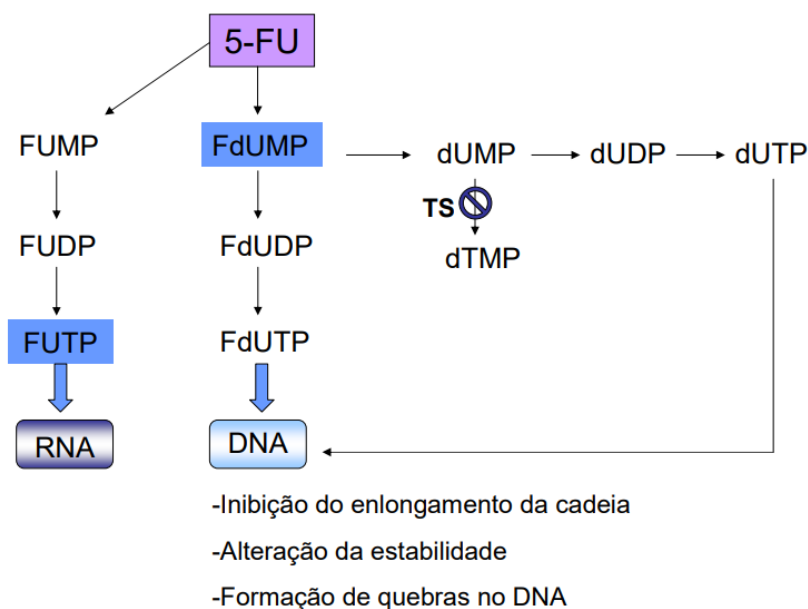


Figura 2: Mecanismo de ação do 5-fluorouracil (5-FU). Legenda: Dentro das células o 5-FU é convertido aos seus metabólitos, que por sua vez podem ser incorporados erroneamente no DNA ou RNA. O FdUMP, considerado o metabólito ativo, atua principalmente inibindo a timidilato sintetase (TS), que leva a incorporação de uracil no DNA. O FdUMP também pode ser fosforilado e incorporado no DNA, o que resulta em diferentes efeitos, tais como a inibição do alongamento da cadeia, alteração da estabilidade e formação de quebras. Fonte: Matuo, 2012.

Quando incorporado ao DNA, o 5-FU inibe sua síntese, interfere com a cadeia de DNA nascente, altera a estabilidade e reparo do DNA, induz quebras simples nas fitas nascentes de DNA e quebras duplas no DNA parenteral (De Angelis e Svendsrud, 2006; Noordhuis et al., 2004). Quando incorporado ao RNA, causa diminuição de sua síntese, inibição da poliadenilação de RNA mensageiro, alteração de sua estrutura secundária, mudanças quantitativas e qualitativas na síntese proteica, incorporação de uracil nos snRNA, os quais representam pequenos RNAs nucleares (Noordhuis et al., 2004).

A resistência aos efeitos citotóxicos do 5-FU é atribuída principalmente a expressão aumentada da enzima timidilato sintetase que compensa a inibição realizada pelo 5-FU (Peters et al., 1995). O aumento da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD), responsável pela metabolização do 5-FU no fígado, pode levar a resistência por diminuir a biodisponibilidade do quimioterápico. A diminuição da expressão de p53 pode levar ao aumento da expressão de DPD, e assim, reduzir a sensibilidade ao 5-FU (Gokare e Finnberg, 2017; Zhang et al., 2017).

A metilação do DNA (adição de grupos metil no carbono 5 da citosina) é outro mecanismo epigenético de resistência bastante estudado, e está associada a inibição da expressão gênica (Moore et al., 2013). Em 2018, um estudo com células de câncer colorretal submetidas a tratamento com 5-FU, observou que em células resistentes ao tratamento, genes envolvidos nas vias de metabolismo de pirimidinas e do citocromo P450 apresentaram através da hipermetilação um importante mecanismo epigenético induzindo as células a adquirir resistência ao 5-FU (Shen et al., 2018).

Conforme dados do INCA, mais de 10% dos pacientes em tratamento com 5-FU irão desenvolver pelo menos algum dos principais efeitos colaterais mais comumente descritos. São eles: dermatite, exantema maculopapular, alopecia, náusea, vômito, anorexia, estomatite, esofagite, faringite, diarreia, granulocitopenia, trombocitopenia e estomatite ulcerativa. Entre 1 a 10% dos pacientes apresentarão pele seca, ulceração gastrointestinal, bradicardia, edema periférico, cefaleia, dor abdominal, manifestações hemorrágicas maiores, e trombocitopenia. Menos de 1% irá apresentar dor no peito, hipotensão, alterações semelhantes à isquemia, ataxia cerebelar, sonolência, hiperpigmentação de face, mãos, fotossensibilidade à radiação UV (ultravioleta), eritrodisestesia palmar-plantar (síndrome mão-pé), coagulopatia, hepatotoxicidade e distúrbios visuais. O 5-FU pode ser potencialmente neurotóxico, mas esses efeitos são raros na prática clínica (Ministério da Saúde - INCA, 2021).

1.4 USO DE NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Nas últimas décadas, novas abordagens terapêuticas em uma escala de aplicações moleculares nanométricas trouxeram novas opções de tratamento na área médica, com grandes desafios na aplicabilidade humana. As nanomoléculas podem ser produzidas a partir de muitos materiais e em variados tamanhos. Por meio da possibilidade de moldar o seu tamanho e sua forma, essas partículas são de extrema utilidade no tratamento de enfermidades, pela capacidade de carrear drogas, ser sinalizador tumoral, e ainda auxiliar no diagnóstico de doenças. Entre os vários tipos de nanopartículas (NP) já estudadas, existem mais comumente as biodegradáveis (proteínas, polímeros, lipídios), as metálicas (ouro, prata, ferro, zinco) e as eletromagnéticas. Diversos estudos já demonstraram a atividade potencializadora destas partículas sobre os efeitos antineoplásicos de determinados quimioterápicos utilizados em oncologia, permitindo uma nova abordagem no tratamento contra o câncer (Disner, 2016; Carvalho Lopes e Pereira Torres, 2020).

Devido a heterogeneidade das neoplasias malignas, novas estratégias que abordam os processos de morte neoplásica estão sendo avaliadas, abrindo espaço para a utilização das NP. O uso destas partículas permitem amenizar os efeitos colaterais disseminados das quimioterapias, em virtude da sua especificidade direcionada ao tecido tumoral e da sua maior capacidade de absorção (Fang et al., 2015; Carvalho Lopes e Pereira Torres, 2020). A área de superfície das NP é inversamente proporcional ao seu tamanho, resultando em uma grande área disponível para carregamento de drogas, conjugação ou ligação com substâncias, o que aumenta sua solubilidade e estabilidade, como apresentado na Figura 3 (Kumar et al., 2013).

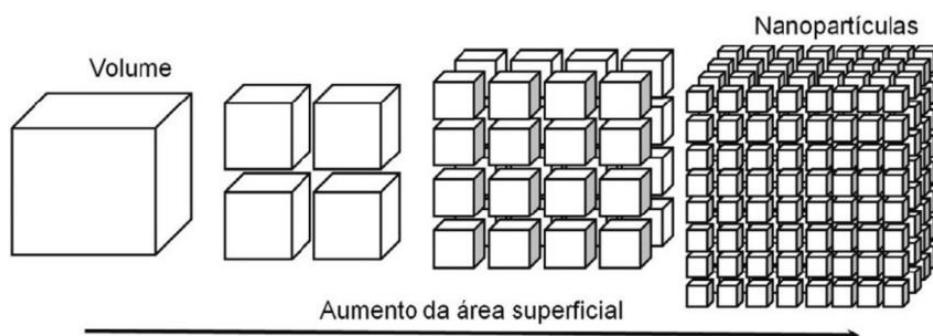


Figura 3: Área de superfície das nanopartículas. Legenda: O aumento da área superficial é provocado pela redução de seu tamanho. Fonte: Da Róz et al., 2015.

As NP podem ser utilizadas por meio de sistema de vetorização passiva, voltada para o acúmulo dessas no endotélio neoplásico que se forma na angiogênese tumoral e possuem

fenestrações com tamanhos entre 100 e 780 nm. Além deste mecanismo de acumulação, existe a técnica de vetorização ativa, onde ligantes projetados na superfície das NP irão interagir especificamente com as células do câncer e seus receptores, como demonstrado na Figura 4. Esses ligantes podem ser anticorpos monoclonais, aptâmeros ou peptídeos (Jurj et al., 2017; Mosquera et al., 2018). Estes dois mecanismos causam um maior acúmulo do medicamento no sítio de ação, possibilitando a administração de doses menores ao paciente, com consequente redução de sua toxicidade (Danhier et al., 2010).

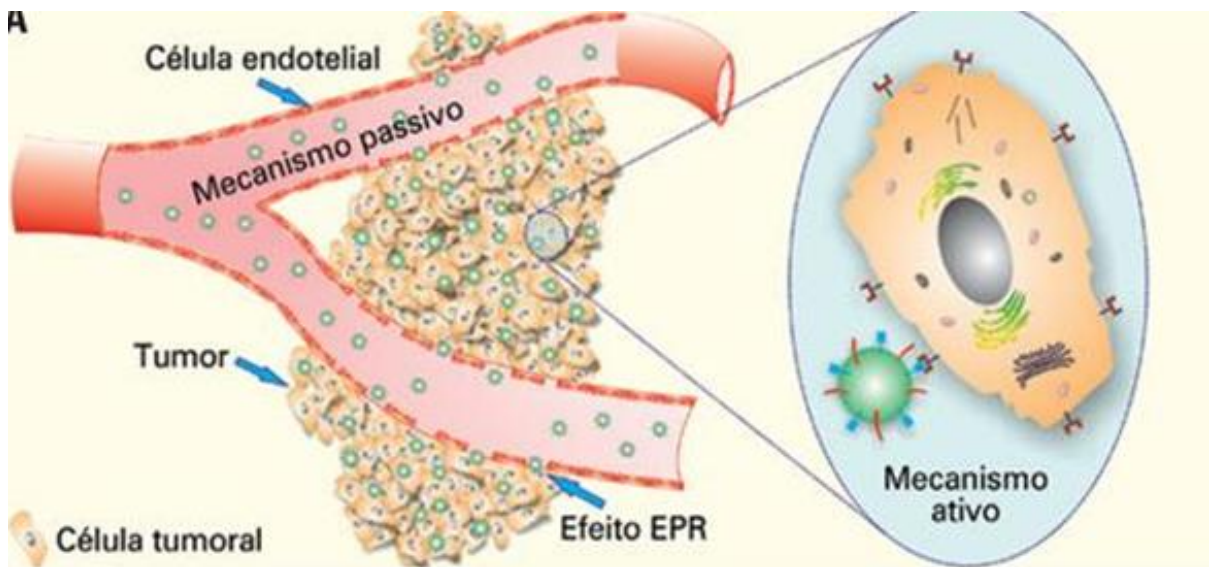


Figura 4: Nanocarreadores no tratamento de câncer. Legenda: Nanocarreadores podem acumular-se no tumor pelo mecanismo passivo, devido à permeabilidade vascular aumentada na região tumoral, ou pelo mecanismo ativo, que também aumenta a captação de nanopartículas pelas células tumorais. Fonte: Adaptado de Vieira e Gamarra, 2016.

Os metais como prata, ouro, platina e ferro são muito utilizados em estudos para tratamento do câncer. Podem ser moldados em vários tamanhos e em variadas formas, apresentando aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos que favorecem a indução da célula cancerígena à morte (Bisht e Rayamajhi, 2016;). O mecanismo que os metais usam para gerar morte celular é principalmente a indução de apoptose ou necrose pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). O excesso de produção de ERO pode ser maléfico para a célula, sendo responsável também por danos à dupla-fita de DNA (Han et al., 2017).

1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (NPAu) podem desempenhar papel fundamental na superação das limitações que os tratamentos convencionais para o câncer apresentam na atualidade, como alta toxicidade e índices de recidivas da doença com resistência as drogas existentes (Bansal et al., 2020). São sintetizadas a partir da redução do ácido tetracloroáurico (Turkevich, 1951), e possuem importantes propriedades como funcionalização de superfície, fluorescência, diferentes formas e tamanhos, além da biocompatibilidade (Tao et al., 2015; Singh et al., 2018). Devido a isso, as NPAu tem sido cada vez mais utilizadas como carreadoras de drogas em diversos estudos. A presença de uma carga negativa na superfície das NPAu as torna facilmente modificáveis, podendo ser utilizadas com facilidade em vários cenários, adicionadas a diversas biomoléculas, como fármacos, ligantes, proteínas ou genes. Além disso, as NPAu têm um grande potencial de ajustes, podendo ser preparadas em uma grande variedade de formas desejáveis e tamanhos de núcleos específicos (1 a 50 nm), o que facilita o controle de sua dispersão (Singh et al., 2018).

Todas estas propriedades fazem com que as NPAu possuam notáveis benefícios, oferecendo muitas possibilidades para serem exploradas como agentes terapêuticos e diagnósticos na oncologia. Somados a isto, a natureza não tóxica e não imunogênica das NPAu, a alta permeabilidade e o efeito de retenção, proporcionam benefícios adicionais que permitem facilmente a penetração e o acúmulo de medicamentos nos locais do tumor (Gao et al., 2021).

Na atualidade, as NPAu apresentam diversas aplicações em terapias oncológicas. Devido às suas propriedades únicas, como absorção e espalhamento de radiação eletromagnética, as NPAu também podem ser utilizadas em terapia fototérmica (ZOU et al., 2016). Outra aplicação vantajosa é na ablação por radiofrequência, onde, devido à sua capacidade de absorver raios X, as NPAu atuam como moléculas-alvo, promovendo o aumento da temperatura quando expostas à radiofrequência externa (Hainfekd et al., 2010).

Além disso, as NPAu têm se destacado na modulação terapêutica, em destaque para a inibição da angiogênese, considerada uma das mais promissoras estratégias para a aplicação destas partículas na terapia dos tumores (Bergers e Benjamin, 2003). Essas nanopartículas também têm sido empregadas com sucesso na indução da hipertermia localizada para destruição de tumores e em terapias fotodinâmicas contra o câncer (Fang et al., 2015). Estudos demonstraram que as NPAu podem absorver luz e calor, permitindo potencializar os efeitos da

radioterapia e aumentando significativamente a sobrevivência a longo prazo em comparação a radioterapia isolada (Hainfeld et al., 2013; Fang et al., 2015).

Temos ainda o uso das NPAu como carreadoras de drogas. Embora a quimioterapia seja o método mais comumente utilizado no tratamento do câncer, seu uso é em muitos casos limitado, principalmente devido aos inúmeros efeitos colaterais, baixa solubilidade e biodistribuição restrita. A eficácia da quimioterapia pode também ser prejudicada por um microambiente tumoral mutável e resistência celular aos fármacos. Devido a estas limitações, a aplicação de sistemas de liberação de drogas que forneçam transporte direcionado eficiente tem sido cada vez mais estudados. Esses sistemas transportadores devem ser capazes de reter uma quantidade adequada do medicamento, contornando mecanismos de resistência aos medicamentos, melhorando a biodistribuição ou impedindo sua remoção rápida. As NPAu foram recentemente examinadas para o potencial de entrega de drogas anticancerígenas, principalmente devido à sua biocompatibilidade, bem como a capacidade de formar complexos estáveis com DNA e RNA (Duncan et al., 2010).

Zheng et al. em 2008, demonstraram que as NPAu conseguem causar um aumento da radioatividade devido a maior absorção da energia da radiação ionizante pelo metal, que acabam por causar as quebras nos DNA de fita dupla, podendo oferecer uma nova abordagem aplicável no tratamento da radioterapia (Zheng et al., 2008). Em 2015, Fytianos et al. investigaram a influência das NPAu com diferentes modificações superficiais em células dendríticas derivadas de monócitos. As NPAu induziram a produção de interleucinas- β 1 e desencadearam respostas celulares inflamatórias *in vitro* (Fytianos et al., 2015).

Em 2020, Della Vechia et al. realizaram um estudo para sintetizar e caracterizar as NPAu em diferentes tamanhos e avaliar sua citotoxicidade em células tumorais e não tumorais. Este estudo demonstrou que as propriedades físico-químicas, a concentração e o tipo celular foram fatores limitantes para o efeito citotóxico das NPAu, confirmando a necessidade de estudos futuros para avaliar a absorção, mecanismo de morte e outros parâmetros bioquímicos necessários para desenvolver novos tratamentos para o câncer (Della Vechia et al., 2020).

Em janeiro de 2022, Uggioni et al. avaliaram o efeito sinérgico de paclitaxel e cisplatina associado a NPAu em células cervicais HeLa. O estudo demonstrou que a combinação dos quimioterápicos com as NPAu potencializou seus efeitos citotóxicos, induzindo sinergismo entre os tratamentos e resultando na morte celular de HeLa por apoptose (Uggioni et al., 2022). Levando em consideração todos esses aspectos, entende-se que o uso clínico de NPAu no tratamento dos tumores malignos possui diversos tipos de aplicabilidade

na prática clínica, porém ainda requer muitos estudos para um melhor conhecimento e utilização desta nanotecnologia.

1.6 JUSTIFICATIVA

A utilização da nanotecnologia visando o aumento da biodisponibilidade dos medicamentos foi fundamental para a indústria farmacêutica. Os produtos produzidos a partir desta tecnologia têm alcançado várias melhorias na resposta terapêutica, uma vez que, têm se observado uma maior estabilidade e uma menor degradação do fármaco no organismo. Além disso, também é possível alcançar melhor eficácia terapêutica utilizando doses menores dos ativos farmacêuticos, impactando inclusive nos custos dos esquemas terapêuticos (Darweesh et al., 2019).

Os medicamentos convencionais utilizados atualmente no tratamento de tumores malignos, quando associados à tecnologia das nanopartículas, têm como objetivo potencializar o efeito antitumoral do fármaco, trazendo benefícios nos resultados do tratamento combinado. Essa associação pode permitir uma liberação sustentada do medicamento, aumentando seu tempo de circulação no organismo e o contato com as células-alvo, o que potencializa seu efeito farmacológico e sua eficácia. Além disto, os nanomedicamentos podem reduzir a toxicidade do tratamento, pois permitem o uso de doses menores do fármaco, resultando em menos efeitos colaterais. Essa redução dos efeitos adversos melhora a tolerância ao tratamento e promove maior adesão do paciente ao esquema terapêutico, otimizando a destruição das células tumorais (Shen et al., 2015; Fan et al., 2017).

Diante disso, este projeto tem como objetivo analisar os efeitos citotóxicos do uso de NPAu em combinação com o 5-FU, metabólito ativo amplamente utilizado no tratamento do câncer de intestino. A proposta é avaliar se essa associação pode potencializar os efeitos terapêuticos, permitindo a utilização de doses reduzidas do fármaco. Isso, por sua vez, pode minimizar a toxicidade associada ao tratamento, proporcionando maior segurança e melhor tolerância por parte dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do 5-FU associado a NPAu em linhagem celular de câncer de intestino do tipo adenocarcinoma (Caco-2).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas de ouro de 20 nm, por meio de síntese química, seguido de caracterização por espectrometria de UV-Vis (ultravioleta visível);
- Avaliar a eficácia de associação entre as NPAu com o fármaco 5-FU, através de caracterização físico-química;
- Avaliar os efeitos citotóxicos do fármaco 5-FU, das NPAu e da associação de ambos na linhagem celular de câncer Caco-2;
- Avaliar os efeitos citotóxicos do fármaco 5-FU, das NPAu e da associação de ambos na linhagem celular saudáveis NIH/3T3;
- Avaliar a hemocompatibilidade do fármaco 5-FU, das NPAu e da associação de ambos;
- Investigar a influência do fármaco 5-FU, das NPAu e da associação de ambos na genotoxicidade celular (Caco-2).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As NPAu foram sintetizadas conforme o método descrito por Turkevich (1951), com adaptações (Della Vechia et al., 2020). Para isso, foi utilizado o precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), o qual foi reduzido quimicamente através do reagente citrato de sódio di-hidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, SP, Brasil), o qual foi utilizado na síntese como agente redutor e estabilizante.

Inicialmente, 16 μL de HAuCl_4 (4 mM) foi diluído em 50 mL de água ultrapura (milli-Q), e então essa solução foi aquecida até 90 °C, sob agitação magnética à 700 rotações por minuto (rpm). Para o controle dimensional das NPAu, preparou-se uma solução de citrato de sódio dihidratado na concentração de 38 mM, diluída em água ultrapura. Essa solução foi aquecida a 50 °C.

Após atingir a temperatura, 5 mL da solução de citrato foi adicionada lentamente por gotejamento na solução de HAuCl_4 . A mistura foi deixada reagir por aproximadamente 15 minutos, resultando em uma coloração roxa, indicativo da formação das NPAu de 20 nm. Ao final do processo, a solução foi à temperatura ambiente e armazenada em tubos revestidos com papel alumínio para evitar exposição à luz. A formação das NPAu foi determinada por análise de espectrofotometria UV-Vis (espectrofotômetro Shimadzu, Ultravioleta 1800), sendo utilizada a região visível (400 nm – 700 nm) para avaliação.

3.2 ASSOCIAÇÃO DO 5-FLUOROURACIL COM AS NANOPARTÍCULAS DE OURO

A associação entre o medicamento 5-FU ($\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2$) (50 mg/mL) com as NPAu de 20 nm, ocorreu através de agitação por um período de 1 hora. Foram utilizadas diferentes doses de 5-FU (0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em 10 % de NPAu.

3.2.1 Potencial Zeta

As medições do potencial zeta (ZP) foram realizadas usando um analisador NanoBrook Omni ZP (Brookhaven Instruments Corp., EUA) com um laser de diodo vermelho

padrão de 40 mW usando a técnica de espalhamento de luz de análise de fase (PALS). A faixa de mobilidade foi entre 101 e 107 mV, a faixa ZP foi entre 500 e 500 mV e o ângulo de espalhamento foi de 15°. As amostras foram medidas em água Milli-Q e as medições foram conduzidas em triplicata a 20 ± 1 °C (Dal Bó et al., 2014; Micheletto et al., 2015; Dos Santos et al., 2016; Dos Santos et al., 2018).

3.2.2 Índice de Polidispersão

A intensidade média do diâmetro e a distribuição do tamanho de partícula das formulações foram determinadas usando a análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando um analisador de tamanho de partícula e potencial zeta NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corp., EUA) com um laser He-Ne coerente monocromático com comprimento de onda fixo de 640 nm, potência de 40 mW e controle de temperatura ativo entre 5 e 110 °C. Nenhum circulador externo foi necessário. Os experimentos de DLS foram realizados em um ângulo de 90°, com o diâmetro variando de 1 nm a 6 µm. O raio hidrodinâmico foi determinado usando a equação de Stokes-Einstein (Dal Bó et al., 2014; Micheletto et al., 2015; Dos Santos et al., 2016; Dos Santos et al., 2018).

3.3 CULTURA CELULAR

Para os ensaios celulares, foram utilizadas células humanas imortalizadas de câncer cólon (Caco-2) e fibroblastos murinos (NIH/3T3) como controle de células saudáveis. A linhagem celular NIH/3T3 foi escolhida, por ser amplamente utilizada como controle em estudos de citotoxicidade de diferentes compostos.

As células (Caco-2 e NIH/3T3) foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm², com meio *Dulbecco's Eagle Modificado* (DMEM), suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino, Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 mg/mL). Para o crescimento e adesão celular, elas foram mantidas em uma estufa umidificada, com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. As trocas de meio foram realizadas em dias alternados, até se obter uma confluência de células viáveis, para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro*. Ao obter a confluência necessária, as células foram tripsinizadas, para isso foi retirado o DMEM da garrafa e adicionado 4 mL de tripsina durante 5 min, ou até as células ficarem em suspensão. Em seguida, foi adicionado 4 mL de DMEM completo para neutralizar a tripsina.

Foi realizada a contagem do número total de células, na câmara *Neubauer* e realizada a diluição dessas células em meio DMEM na concentração de 10^4 células/poço e plaqueadas em uma placa de cultura de fundo plano de 96 poços. As mesmas foram incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37°C , a fim de proporcionar a aderência das células na superfície da placa. Após o período de incubação as células foram tratadas com diferentes doses de 5-FU (0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$), 5-FU + NPAu (0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU diluídas em 10 % de NPAu em DMEM) e 10 % de NPAu em DMEM, por um período de 24 ou 48 horas.

3.3.1 Ensaio De Viabilidade Celular - MTT

A viabilidade celular, foi avaliada através da redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Ao ser reduzido, o MTT forma cristais de formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Essa reação de redução ocorre nas mitocôndrias das células, fazendo com que a viabilidade celular seja diretamente proporcional à produção dos cristais de formazan (Mosmann, 1983).

Neste estudo, após o tempo de incubação de 24 ou 48 horas das células com os tratamentos específicos, foi retirado o sobrenadante e 100 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado em cada poço. Na sequência, a placa foi incubada por três horas em uma estufa a 37°C e 5 % de CO_2 para permitir a reação de formação do formazan.

Após o período de incubação, o sobrenadante celular foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μL álcool isopropílico. Por fim, a placa foi analisada em um leitor de placas por absorvância, no comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade celular foi determinada, através da comparação dos resultados das absorvâncias dos grupos testes, com as absorvâncias do grupo controle incubado apenas com DMEM, ou seja, o grupo que possui apenas células viáveis. Sendo assim, os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular, onde o grupo controle mimetiza 100 % de células vivas.

3.4 AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE

A hemocompatibilidade foi avaliada, através do teste de hemólise, o qual foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Feuser e colaboradores (2015). Para isso,

os eritrócitos humanos foram obtidos de três doadores saudáveis. O sangue foi coletado em tubos contendo 3,2 % de citrato de sódio. O sangue total, 3 mL, foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm para remover o sobrenadante, então foram feitas três lavagens com solução salina (0,9 % cloreto de sódio - NaCl) e centrifugado por três vezes para remover outras células e vestígios de plasma. Após a terceira lavagem, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram diluídos com 1,5 mL de solução salina (0,9 % NaCl).

Após a lavagem final, os eritrócitos foram diluídos em tubo Eppendorf em 2 mL de solução salina e, em seguida, 40 µL da diluição foram adicionados a 960 µL de soro fisiológico em novo tubo. Os eritrócitos foram incubados com os tratamentos a 37 °C sob condições de agitação (100 rpm) por 60 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min, e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi medida a 540 nm (SpectraMax M3). Como controles positivo e negativo, 40 µL da suspensão de eritrócitos foram incubados com 960 µL de água destilada e solução salina, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos por meio de porcentagem da hemólise, obtidos a partir da equação abaixo:

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100$$

Onde:

- D_t = absorbância amostra teste;
- D_{nc} = absorbância controle negativo;
- D_{pc} = absorbância controle positivo.

3.5 ENSAIO COMETA *in vitro*

O ensaio cometa, é uma técnica sensível e relativamente simples para a detecção de danos no DNA em nível celular. Foi realizado o ensaio cometa versão alcalina, conforme descrito por Collins et al. (2023) e seguindo as diretrizes atualizadas do MIRCA (Møller et al., 2020). O termo "cometa" refere-se ao padrão característico de migração do DNA através do gel de eletroforese, que frequentemente se assemelha à forma de um cometa. Para a realização do experimento, núcleos celulares foram embebidos em uma camada fina de agarose sobre lâminas de microscopia.

Para isso, foi utilizado a linhagem celular Caco-2, a qual foi cultivada nas condições específicas, como já descrito anteriormente. As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (2×10^6 células/poço) e incubadas por 24 horas, para aderirem na placa. Após esse período, as células foram tratadas com 5-FU (0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5 µg/mL), 5-FU + NPAu (0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5 µg/mL de 5-FU diluídas em 10 % de NPAu em DMEM) e 10 % de NPAu em DMEM, por um período de 48 horas. Vale ressaltar, que o grupo controle foi tratado apenas com DMEM. Ao final do período de incubação, as células foram desaderidas utilizando tripsina, centrifugadas e diluídas em tampão PBS.

O preparo das lâminas foi realizado a partir da mistura de 20 µL da amostra com 100 µL de agarose *Low Melting Point* (0,75%). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de fusão normal (1,5%) em dois pontos (50 µL em cada ponto), coberta posteriormente com duas lamínulas (1 em cada ponto), e levada então à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4 °C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas foram imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana. As lâminas foram incubadas em solução alcalina (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos para desdobramento do DNA, seguido de eletroforese a ~ 1V/cm por 30 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela.

Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com Syber Gold (1:10.000) (Invitrogen, EUA) para análise. Para avaliação dos danos, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x utilizando o programa Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK), onde foram avaliadas 100 células por amostra. As células foram classificadas de forma automática quanto às proporções do *Tail intensity* (%). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.1.1. Para o Ensaio Cometa, foi aplicado o teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-

teste de Dunnett, a fim de avaliar as diferenças entre os grupos de tratamento e o grupo controle. Além disso, foi utilizado o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey, para comparar os efeitos do medicamento isolado e sua associação com nanopartículas de ouro (NPAu).

No ensaio de viabilidade celular, valores de viabilidade reduzidos para níveis inferiores a 70% foram considerados indicativos de citotoxicidade aparente. As diferenças entre os tratamentos com o quimioterápico isolado e a combinação com NPAu (10%) foram avaliadas por meio do ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média, sendo considerados estatisticamente significativos os valores de $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.1.1 Espectrofotometria UV-Vis das nanopartículas de ouro

Para confirmar a eficácia da síntese, as NPAu foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis, apresentando picos de absorção máxima em 525 nm, característicos de NPAu com tamanho médio de 20 nm. Além disso, as NPAu sintetizadas apresentaram a coloração roxa específica para essa faixa de tamanho (Hauptenthal et al., 2019).

4.1.2 Potencial Zeta (ZP)

A análise do ZP foi realizada para avaliar a influência do fármaco 5-FU na carga superficial das NPAu. Os resultados demonstraram uma mudança significativa no ZP das partículas, sugerindo que a interação entre o fármaco e as NPAu levou à formação de uma camada na superfície das NPAu, confirmando o processo de associação entre os compostos.

Na ausência do fármaco, o ZP das NPAu suspensas em água Milli-Q foi de aproximadamente $\approx -5,5 \pm 0,5$ mV. Este valor indica uma baixa carga superficial, insuficiente para manter uma suspensão coloidal estável. Como consequência, pode ocorrer atração eletrostática entre as partículas, favorecendo processos de separação de fases, precipitação ou autoagregação ao longo do tempo.

A alteração no ZP após a associação com o 5-FU sugere que o fármaco não apenas interage, mas possivelmente recobre a superfície das NPAu, modificando suas propriedades eletrostáticas. Essa modificação pode desempenhar um papel importante na estabilidade coloidal, no comportamento biológico e na eficácia terapêutica das nanopartículas funcionalizadas.

A Figura 5 apresenta os valores de ZP das NPAu na presença de diferentes concentrações de 5-FU. Observou-se que, à medida que a concentração de 5-FU aumentava, os valores negativos do ZP também se tornavam mais pronunciados, indicando interações significativas entre o fármaco e a superfície das NPAu. A alteração encontrada no ZP sugere que o 5-FU forma uma camada de revestimento nas NPAu, contribuindo para uma estabilização coloidal marginal das partículas. Esse efeito estabilizador foi evidente até a concentração de 15

μL (50 mg/mL) de 5-FU, ponto a partir do qual não foram detectadas alterações adicionais no ZP, mesmo com o aumento da concentração do fármaco. Esses resultados indicam que há um limite na capacidade das nanopartículas de interagir e se recobrir com 5-FU, destacando a importância de otimizar as concentrações para maximizar a estabilidade e funcionalidade das NPAu revestidas.

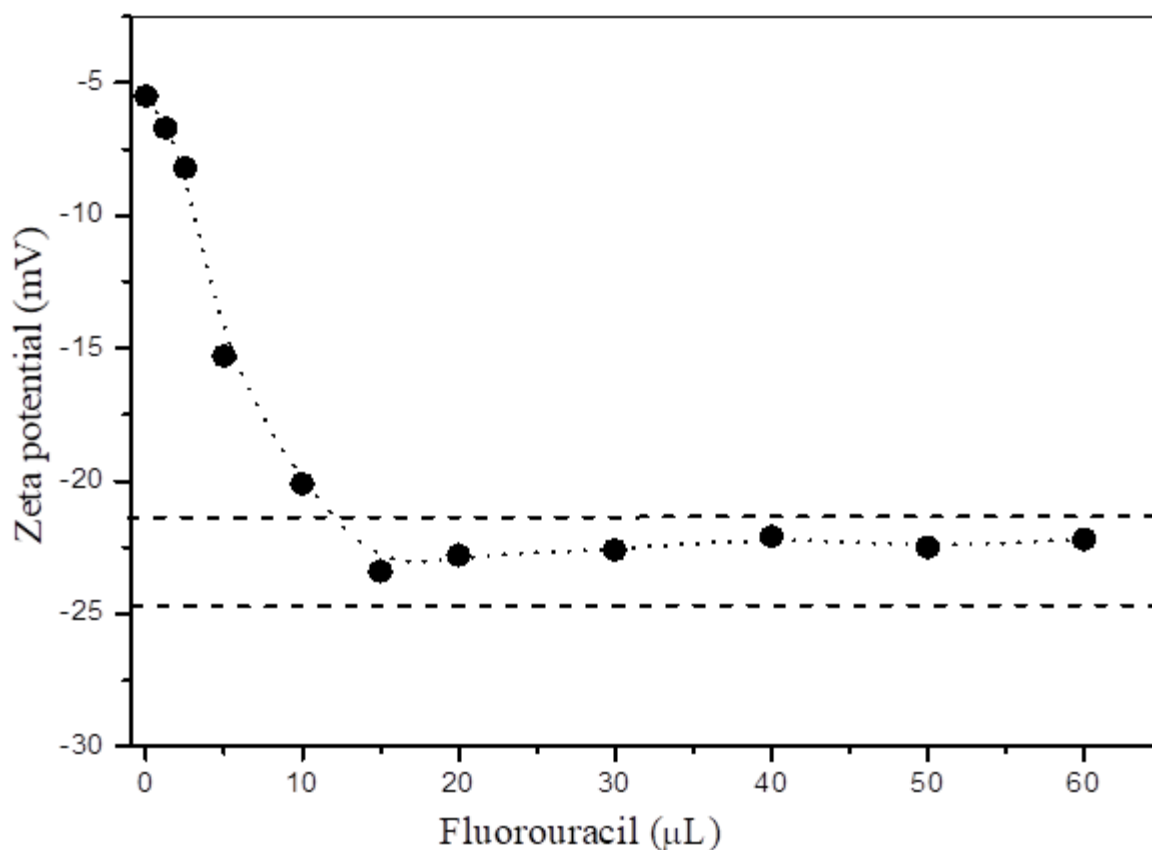


Figura 5: Perfis de potencial zeta (ZP) das nanopartículas de ouro (NPAu) na ausência e presença do fármaco fluorouracil (5-FU). Legenda: É demonstrado, as variações no ZP das NPAu em função das concentrações crescentes de 5-FU. Conforme a concentração do fármaco aumenta, observa-se uma intensificação nos valores negativos do ZP, sugerindo interações relevantes entre o 5-FU e a superfície das NPAu. Fonte: Da Autora, 2024.

4.1.3 Índice de Polidispersão (IPd)

A avaliação dos resultados do Índice de Polidispersão (IPd) demonstrou que na ausência do fármaco, as NPAu exibiram um decaimento rápido, associado a um diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 17,9 nm e um IPd inferior a 0,3 indicando uma suspensão coloidal relativamente homogênea, porém com estabilidade limitada e boa uniformidade.

Por outro lado, com a adição de 5-FU observou-se um decaimento mais lento, acompanhado por um aumento no diâmetro hidrodinâmico, variando entre 20,0 e 44,0 nm, e um IPd reduzido ($<0,2$), como também visto na Figura 6.

Adicionalmente, as NPAu associadas a diferentes concentrações do fármaco apresentaram diâmetros médios progressivamente maiores, sugerindo que o 5-FU forma uma camada na superfície da NPAu após associação, estabilizando-as de forma dose-dependente (Tabela 1).

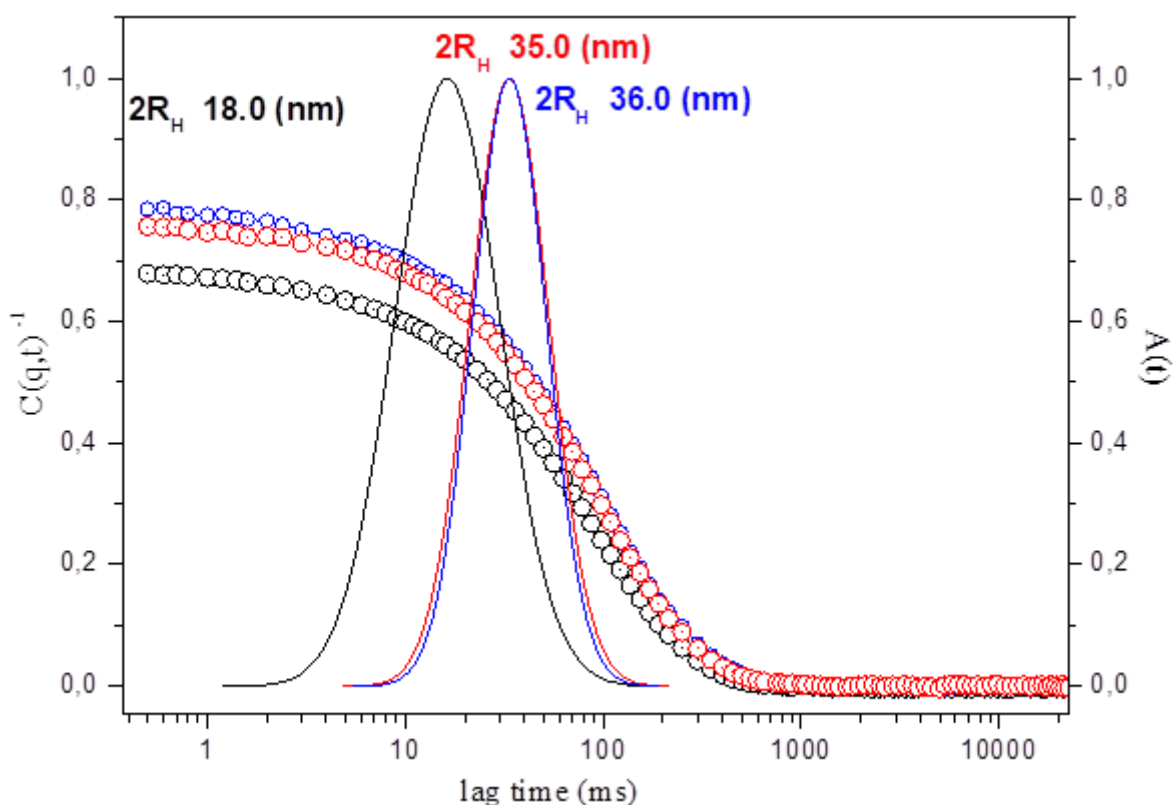


Figura 6: Índice de Polidispersão das nanopartículas de ouro (NPAu) na ausência e presença do fármaco 5-Fluoruracil (5-FU). Legenda: Está representado as funções de autocorrelação típicas $C(q,t)$ e distribuições dos tempos de relaxamento $A(t)$ no ângulo de espalhamento de 90° conforme revelado pelas funções de análise CONTIN de soluções de nanopartículas de ouro na ausência e presença do fármaco em azul (15 μL , 50,0 mg/mL) e em vermelho (30 μL , 50,0 mg/mL). Fonte: Da Autora, 2024.

Tabela 1: Raio hidrodinâmico (UR), índice de polidispersão (IPd), potencial zeta (ZP) de nanopartículas de ouro (NPAu) livres e NPAu associados a soluções de 50,0 mg/mL de 5-Fluorouracil (5-FU).

Sample	2 R _H (nm)	IPd	ZP (mV)
NPAu	17.9	≤0.3	-5.5 ± 0.5
NPAu + Fluorouracil (1,25 µL)	19.8	≤0.2	-6.7 ± 0.8
NPAu + Fluorouracil (2,5 µL)	22.6	≤0.2	-8.2 ± 1.1
NPAu + Fluorouracil (5 µL)	24.8	≤0.2	-15.3 ± 0.9
NPAu + Fluorouracil (10 µL)	26.5	≤0.2	-20.1 ± 1.0
NPAu + Fluorouracil (15 µL)	35.0	≤0.2	-23.4 ± 0.8
NPAu + Fluorouracil (20 µL)	38.2	≤0.2	-22.8 ± 1.0
NPAu + Fluorouracil (30 µL)	36.0	≤0.2	-22.6 ± 0.9
NPAu + Fluorouracil (40 µL)	40.2	≤0.3	-22.1 ± 1.2
NPAu + Fluorouracil (50 µL)	39.8	≤0.3	-22.5 ± 0.9
NPAu + Fluorouracil (60 µL)	44.0	≤0.2	-22.2 ± 1.3

Fonte: Da Autora, 2024.

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

Após a realização de testes para a caracterização físico-química do 5-FU associado a NPAu, foi então realizada a avaliação da citotoxicidade dos compostos estudados. Os efeitos do tratamento com 5-FU isolado, 5-FU + NPAu e NPAu isolada na viabilidade celular foram avaliados através do ensaio de MTT para investigar a citotoxicidade dos compostos testados em diferentes concentrações e condições experimentais.

Seguindo o preconizado na ISO 10993-5 publicada em 2009 e revisada em 2022 e que descreve métodos de teste para avaliar a citotoxicidade in vitro de dispositivos médicos, foram considerados valores de viabilidade celular menores que 70% como indicativo de citotoxicidade considerável. Os resultados demonstrados na figura 7 para células tumorais Caco-2 e na figura 8 para células não tumorais NIH/3T3 evidenciam que os tratamentos avaliados por um período de 24 horas não apresentaram citotoxicidade significativa, apresentando viabilidade celular superior a 70%, mantendo níveis semelhantes ao controle em todas as condições testadas.

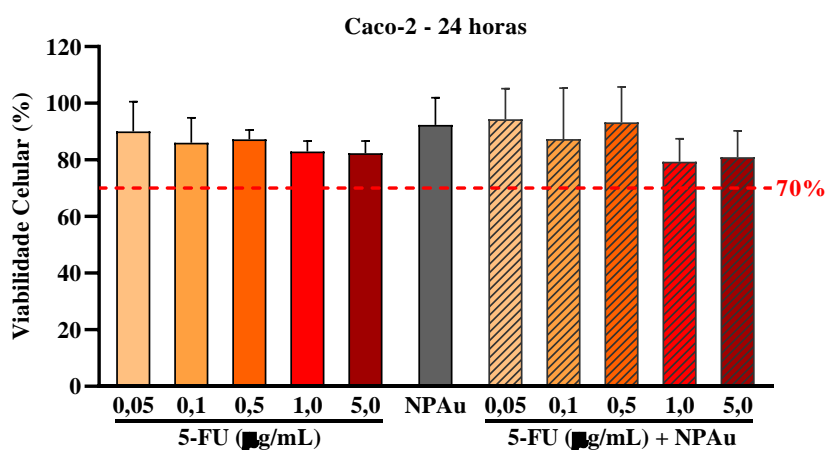


Figura 7: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de Caco-2 tratadas por 24 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN. Legenda: Os dados estão apresentados em gráfico de barras com valores de média \pm desvio padrão da média. Valores de viabilidade menores que 70% são indicativos de citotoxicidade considerável. Fonte: Do Autor, 2024.

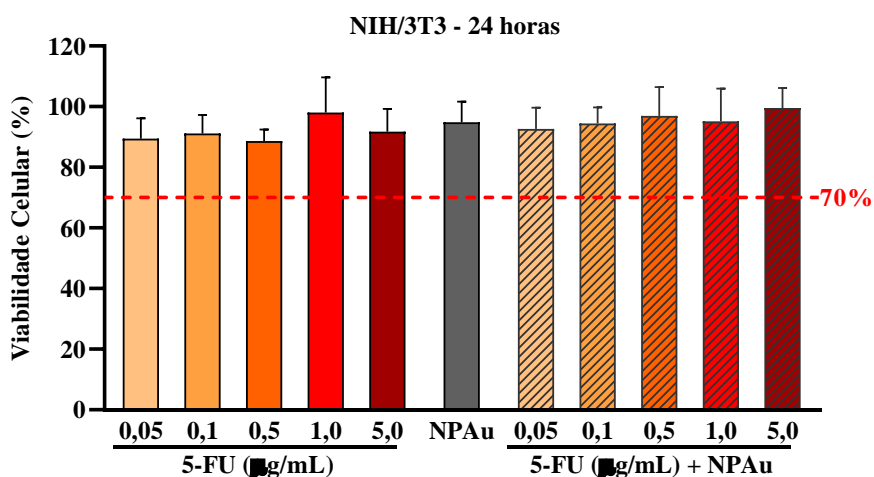


Figura 8: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de NIH/3T3 tratadas por 24 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN. Legenda: Os dados estão apresentados em gráfico de barras com valores de média \pm desvio padrão da média. Valores de viabilidade menores que 70% são indicativos de citotoxicidade considerável. Fonte: Do Autor, 2024.

Na análise do gráfico de tratamento das células Caco-2 após um período de 48 horas de exposição (figura 9), observou-se que quando utilizado isoladamente o 5-FU apresentou citotoxicidade apenas na dosagem de 5,0µg/mL. Por outro lado, quando associado a nanopartícula, o medicamento 5FU resultou em uma citotoxicidade aumentada na linhagem celular Caco-2, apresentando valores de viabilidade celular menores que 70%, indicativos de citotoxicidade considerável nas doses de 0,1 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1 µg/mL e 5 µg/mL, com

diferença estatisticamente significativa nas doses de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao grupo 5-FU nas mesmas dosagens, indicando uma citotoxicidade adicional induzida pela associação com as NPAu, que não foi observado com o fármaco utilizado de maneira isolada. Já as NPAu, quando avaliadas isoladamente, não demonstraram efeitos citotóxicos, mantendo a viabilidade celular em níveis comparáveis ao grupo controle.

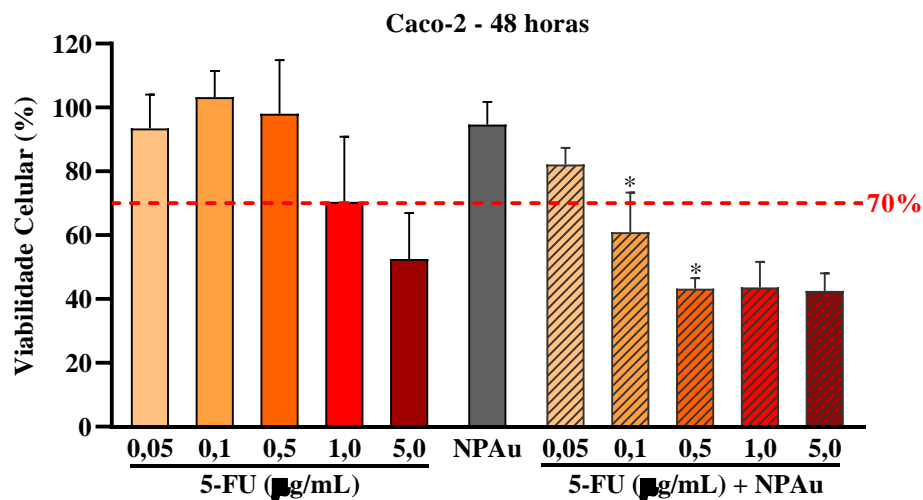


Figura 9: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de Caco-2 tratadas por 48 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN. Legenda: Os dados estão apresentados em gráfico de barras com valores de média \pm desvio padrão da média. Valores de viabilidade menores que 70% são indicativos de citotoxicidade considerável. * Indica diferença significativa entre a mesma concentração de 5-FU quando em associação com NPAu (10%) (ANOVA de duas vias, seguido pelo *post hoc* de Tukey, considerando $P < 0,05$ como estatisticamente significativo). Fonte: Do Autor, 2024.

Ao analisar o gráfico de 48 horas para as células não tumorais (NIH/3T3), a figura 10, demonstrou citotoxicidade considerável em todas as doses avaliadas do 5-FU, quando utilizado de maneira isolada. No entanto, quando o medicamento foi associado a NPAu, houve uma redução significativa na citotoxicidade induzida pelo 5-FU. Especificamente na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ não houve citotoxicidade significativa, apresentando nível de viabilidade celular superior a 70%.

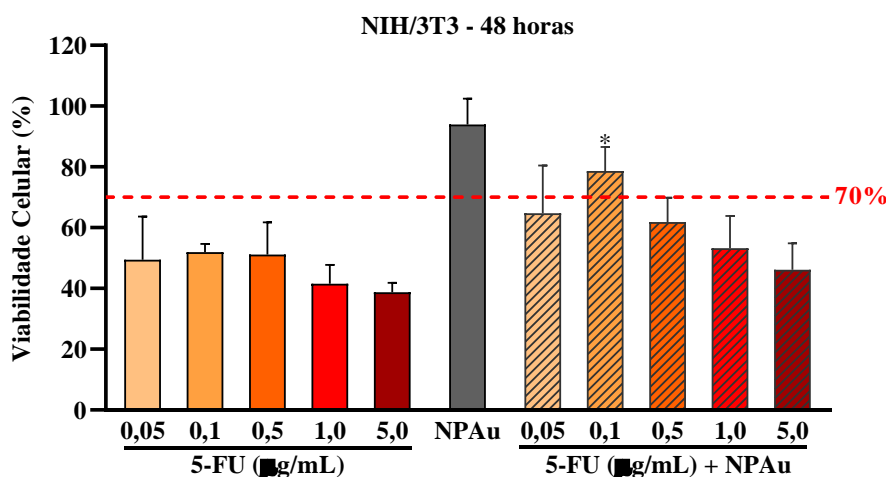


Figura 10: Avaliação da viabilidade celular (%) em cultura celular de NIH/3T3 tratadas por 48 horas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN. Legenda: Os dados estão apresentados em gráfico de barras com valores de média \pm desvio padrão da média. Valores de viabilidade menores que 70% são indicativos de citotoxicidade considerável. * Indica diferença significativa entre a mesma concentração de 5-FU quando em associação com NPAu (10%) (ANOVA de duas vias, seguido pelo *post hoc* de Tukey, considerando $P < 0,05$ como estatisticamente significativo). Fonte: Do Autor, 2024

4.3 AVALIAÇÃO DA HEMOCOMPATIBILIDADE

A hemocompatibilidade dos compostos foi avaliada através da realização do teste de hemólise. Os eritrócitos foram expostos às seguintes condições experimentais: 5-FU (5 $\mu\text{g/mL}$), 5-FU + NPAu e NPAu. Os resultados demonstraram, que nenhum dos compostos testados causou danos hemolíticos, apresentando todas as razões hemolíticas abaixo de 5%, razão esta considerada segura para biomateriais de acordo com a ISO/TR7406. Além disso, não foram observados efeitos adversos como aglutinação ou alterações na morfologia dos eritrócitos (Figura 11).

Tabela 2: Avaliação da hemocompatibilidade do 5-Fluoruracil (5 $\mu\text{g/mL}$), 5-Fluoruracil + NPAu e NPAu, representado pela taxa de hemólise (%).

GRUPO TESTE	TAXA DE HEMÓLISE (%)
Controle Positivo (+)	100 %
Controle Negativo (-)	0 %
NPAu	1,1 %
5-FU (5 $\mu\text{g/mL}$)	1,4 %
5-FU (5 $\mu\text{g/mL}$) + NPAu	1,2 %

Legenda: NPAu: nanopartículas de ouro. Valores de razões hemolíticas inferiores a 5% são consideradas seguras para biomateriais. Fonte: Do Autor, 2024.

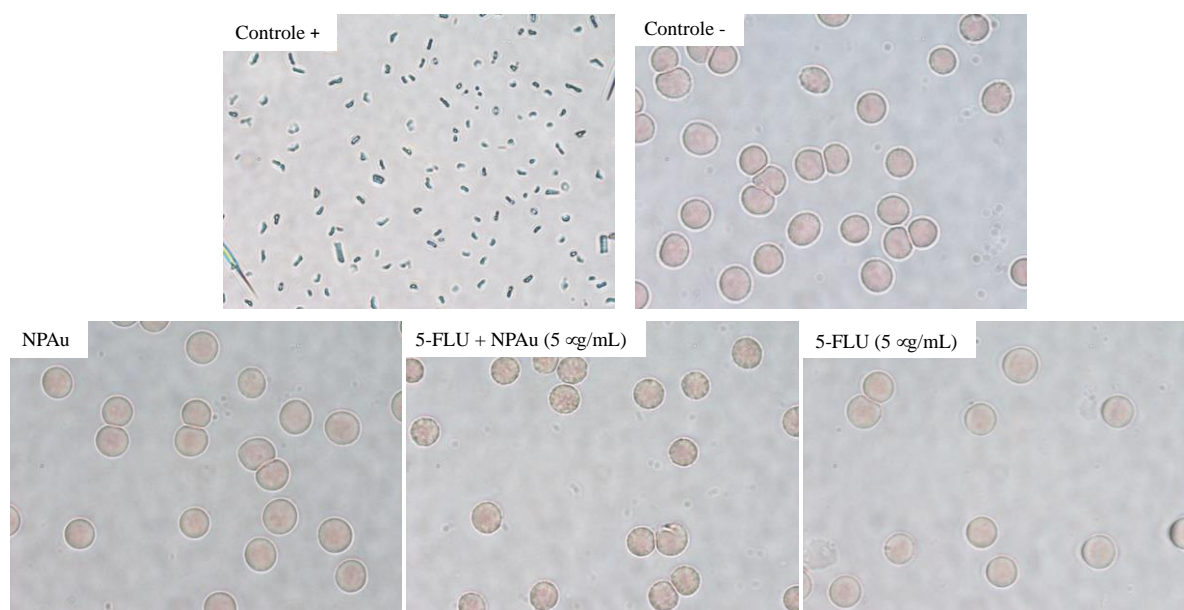


Figura 11: Efeito do Fluorouracil (5-FU), 5-FU + NPAu e NPAu sobre a morfologia dos eritrócitos. Legenda: O grupo controle + apresenta aponta células fraturadas e lisadas. Por outro lado, os grupos testes e o grupo controle -, apresentam eritrócitos com margens bem definidas, sem fraturas ou lise. Fonte: Do Autor, 2024.

4.4 ENSAIO COMETA *in vitro*

Os danos ao DNA foram avaliados através do ensaio cometa alcalino em células Caco-2 submetidas ao tratamento com 5-FU, NPAu e associação de 5-FU + NPAu, e o grupo controle, que foi tratado apenas com DMEM. Foram utilizadas as seguintes dosagens do fármaco: 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e 5,0 µg/mL; e as nanopartículas utilizadas em concentração constante de 10%.

O grupo controle apresentou níveis muito baixos de dano ao DNA. Nos grupos tratados com 5FU, isolado ou em combinação com NPAu, foi observado um aumento no dano celular em todas as dosagens testadas em comparação ao grupo controle. No entanto, a maioria dos grupos não apresentou diferenças estatisticamente significativas, com exceção do grupo tratado com 5-FU na concentração de 1,0 µg/mL isolado, e 0,5 e 5,0 µg/mL associado às NPAu, que exibiram um aumento significativo nos danos ao DNA.

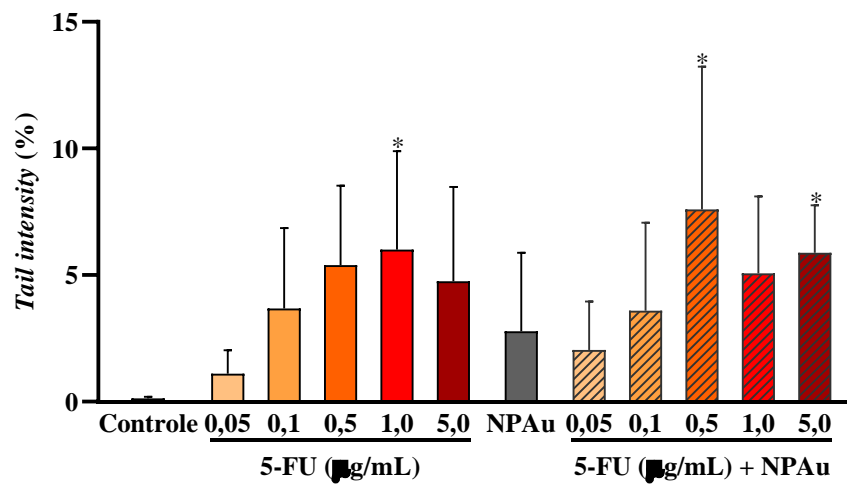


Figura 12: Avaliação dos danos ao DNA *in vitro* pelo parâmetro *Tail intensity* (%) em cultura celular de Caco-2 tratadas com 5-fluorouracil (5-FU) em diferentes concentrações e sua associação com 10% de nanopartículas de ouro (NPAu) em DMEN. Legenda: Os dados estão apresentados em gráfico de barras com valores de média \pm desvio padrão da média. As diferenças versus o grupo controle foram analisadas utilizando ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Dunnett, considerando $P < 0,05$ como estatisticamente significativo. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as concentrações de 5-FU e sua associação com NPAu (10%) na mesma concentração do quimioterápico (ANOVA de duas vias). *Diferença significativa em relação ao grupo controle. Fonte: Do Autor, 2024.

5 DISCUSSÃO

O número estimado de casos novos de câncer de intestino no Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 45.630 casos, correspondendo a um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes, sendo 21.970 casos entre os homens e 23.660 casos entre as mulheres (Brasil, 2023). Esse alto índice destaca a importância de estratégias eficazes no diagnóstico e tratamento da doença, que ainda representa um grande desafio à saúde pública no país.

O tratamento de escolha para o câncer de intestino é a ressecção cirúrgica completa do tumor, com esvaziamento dos linfonodos regionais, alcançando altas taxas de cura. No entanto, muitas vezes, a cirurgia não é uma opção viável. Em muitos casos, o tumor já invadiu estruturas adjacentes, impossibilitando a remoção completa, ou o paciente já apresenta metástases a distância no momento do diagnóstico o que contraindica o tratamento cirúrgico (Cuesta et al., 2012). São nesses casos que a quimioterapia desempenha um papel crucial, sendo realizada quando a cirurgia é contraindicada e, também, após procedimento cirúrgico, como terapia adjuvante no intuito de reduzir as taxas de recidiva da doença (Ychou et al., 2003).

Entre as alternativas de tratamento com quimioterápicos, destaca-se a utilização do 5-FU, um dos medicamentos mais utilizados no tratamento do câncer intestinal (Breda, 2010). Embora os benefícios da administração de 5-FU em quimioterapia estejam bem estabelecidos, a toxicidade associada a este medicamento é um grande problema clínico, estando associados a ocorrência de efeitos colaterais hematológicos, digestivos e cutâneos, causando toxicidade tanto para as células cancerosas como para as células normais, em virtude das altas doses utilizadas (Blaschke et al., 2011). Por este motivo, faz-se necessário, buscar novas alternativas, ou terapias associadas para minimizar estes efeitos indesejados.

Entre as nanopartículas metálicas, as NP_{Au} se destacam devido à sua biocompatibilidade e ampla aplicação na área da saúde. Suas propriedades físico-químicas, como tamanho, forma, carga superficial e funcionalização, determinam suas atribuições e possibilidades de uso, permitindo sua aplicação como biossensores, agentes citotóxicos e vetores para a entrega controlada de fármacos. Além disso, essas características influenciam diretamente sua eficiência terapêutica e segurança biológica. Portanto, para garantir sua eficácia em aplicações biomédicas, é essencial o desenvolvimento de protocolos de síntese que possibilitem a obtenção de NP_{Au} com formatos e tamanhos bem definidos (Kimling et al., 2006).

Devido à sua capacidade de se acumular seletivamente no tecido tumoral, as NPAu podem servir também como detectores de células cancerosas (Huang et al., 2007). Essas características podem vir a maximizar a eficácia do fármaco e minimizar os efeitos colaterais, tipicamente associados ao uso de quimioterápicos no tratamento do câncer, por meio da redução da toxicidade sistêmica (Orza et al., 2013).

Sabendo do grande potencial terapêutico das NPAu, avaliar suas propriedades físico-químicas é importante para melhor compreender a interação de suas soluções combinadas com o 5-FU. A espectrofotometria de absorção óptica UV-vis é uma das técnicas mais eficientes para o estudo de estruturas atômicas e moleculares, sendo capaz de medir a quantidade de luz ultravioleta ou radiação visível absorvida por uma substância em solução (Behera et al., 2012). Sendo assim, neste trabalho foi utilizado a espectrofotometria UV-Vis e observou-se picos de absorção máxima em 525nm com tamanho médio de 20nm, característico de NPAu. Estes resultados vão de acordo com o trabalho de Della Vechia et al. (2020), que também relataram máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda para nanopartículas de ouro de 20 nm.

Para avaliar a magnitude e estabilidade potencial dos sistemas coloidais, foram analisados os valores do ZP. Os resultados indicaram que a interação entre o fármaco e as NPAu levou à formação de uma camada na superfície das nanopartículas, confirmando o processo de associação entre os compostos. Por outro lado, na ausência do fármaco, observou-se uma baixa carga superficial, o que compromete a estabilidade coloidal. Como consequência, essa baixa carga dificulta a manutenção da suspensão coloidal ao longo do tempo, favorecendo processos como separação de fases, precipitação ou autoagregação. A modificação no ZP após a associação com o 5-FU sugere que o fármaco não apenas interage com as NPAu, mas possivelmente reveste sua superfície, alterando suas propriedades eletrostáticas. Essa mudança pode influenciar diretamente a estabilidade coloidal, o comportamento biológico e a eficácia terapêutica das nanopartículas funcionalizadas (Figat et al. 2023).

Estudos realizados por Schaffazick et al. (2003) e Mohanraj & Chen (2006) demonstraram que nanopartículas com ZP de ± 30 mV apresentam maior estabilidade em suspensão. Além disso, observou-se que, à medida que a concentração do 5-FU aumentava, os valores negativos do ZP se intensificavam, sugerindo interações mais relevantes entre o fármaco e a superfície das NPAu, especialmente quando o ZP se aproximava de -30 mV (Figura 5).

Elbially et al. (2015) em sua pesquisa utilizando NPAu magnéticas carregadas com um quimioterápico chamado doxorubicina, obteve valores de potencial zeta das NPAu magnéticas de $-31,1 \pm 2,5$ mV seguido de $-25,9 \pm 2,4$ para NPAu magnéticas carregadas com o medicamento, mesmo resultado encontrado neste estudo. Esses fatos somados sugerem que houve, em todos os casos, uma interação eletrostática entre fármaco e nanopartícula. O valor encontrado de carga de superfície pode estar associado ao precursor como agente redutor e nucleação do crescimento de nanopartículas durante o processo de síntese. Em outros estudos, os autores relataram a síntese de NPAu mais estáveis, ressaltando a importância de avaliação das caracterizações das partículas (Dal Bó et al., 2014; Micheletto et al., 2015; Dos Santos et al., 2016; Dos Santos et al., 2018). Esses fatos somados sugerem que houve, em todos os casos, uma interação eletrostática entre fármaco e a nanopartícula.

A análise do IPd fornece informações sobre a homogeneidade das soluções (Nemen e Senna, 2011). A caracterização da polidispersidade é essencial em aplicações de nanopartículas, pois há certa dificuldade em controlar a uniformidade de toda a amostra com a química de conjugação de superfície e, muitas vezes, pode ocorrer agregação de partículas (Clayton et al., 2016). Todas as soluções apresentaram IPd inferior a 0.3, indicando assim a formação de sistemas monodispersos (Nemen e Senna, 2011). Os dados encontrados na análise do IPd sugerem que o 5-FU interage diretamente com a superfície das NPAu, formando uma camada de revestimento que contribui para o aumento do tamanho médio das partículas. Esses achados reforçam a influência do 5-FU nas propriedades físico-químicas das NPAu, indicando potencial para modulação de estabilidade e funcionalidade em aplicações terapêuticas.

A avaliação da citotoxicidade dos compostos 5-FU, NPAu e a associação de 5-FU + NPAu em células de câncer de intestino da linhagem Caco-2 e em células de fibroblastos saudáveis da linhagem NIH/3T3 foi realizada pelo ensaio de MTT. Considerando os valores de viabilidade celular menores que 70% como indicativo de citotoxicidade considerável, conforme descrito na ISO 10993-5, observou-se que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as variadas concentrações de 5-FU isolado e em sua associação com NPAu após um período de exposição de tratamento de 24 horas em ambas as linhagens celulares.

Com o prolongamento do tempo de exposição para 48 horas, observou-se uma redução significativa na viabilidade celular das células Caco-2, indicando um efeito citotóxico mais pronunciado nesta linhagem. Em contraste, as células NIH/3T3 apresentaram menor suscetibilidade ao tratamento, sugerindo um perfil diferencial de toxicidade entre as linhagens celulares analisadas. O 5-FU isolado apresentou citotoxicidade na linhagem Caco-2 apenas na

concentração de 5,0 µg/mL. No entanto, quando combinado com a NPAu, a viabilidade celular foi reduzida para valores abaixo de 70% já a partir da dose de 0,1 µg/mL, demonstrando um efeito sinérgico entre os compostos e potencializando a ação citotóxica sobre as células tumorais.

Na linhagem NIH/3T3, após 48 horas de exposição ao 5-FU isolado, observou-se citotoxicidade em todas as doses testadas. Entretanto, a associação do 5-FU com a NPAu resultou em uma redução da citotoxicidade, efeito mais evidente na dose de 0,1 µg/mL. Esses dados sugerem que a NPAu pode desempenhar um papel modulador na toxicidade do 5-FU, reduzindo seus efeitos adversos sobre células não tumorais.

A biocompatibilidade das NPAu foi confirmada, uma vez que sua administração isolada não resultou em redução significativa na viabilidade celular. Esse achado é fundamental para a utilização dessas nanopartículas como transportadores de fármacos, reforçando seu potencial para minimizar os efeitos colaterais indesejáveis dos quimioterápicos convencionais.

Em estudo realizado por Mattos et al. (2013) em células tumorais HEP-2, o 5-FU foi encapsulado em nanopartículas poliméricas preparadas a partir de polímeros ácido polilático (PLA) e polietilenoglicol (PEG). A atividade citotóxica do 5-FU livre e encapsulado em nanopartículas de PLA e PLA-PEG foi avaliada nos períodos pré-determinados 24, 48 e 72 horas; porém, somente após 72 horas é que tanto o fármaco livre quanto as formulações nanoestruturadas inibiram 50% da viabilidade celular. Esses resultados sugerem que as atividades citotóxicas das nanopartículas podem estar relacionadas ao tempo de incubação das células tratadas, como também apresentado neste estudo. No ensaio de citotoxicidade observou-se que tanto o fármaco livre quando o encapsulado nas duas formulações de nanopartículas apresentaram eficácia semelhante.

Estudo realizado por Chaves et al. 2013 avaliou a citotoxicidade das nanopartículas de quitosana e carragenanas encapsuladas com 5-FU através de ensaio do MTT. O estudo mostrou que o 5-FU isolado inibiu fortemente o crescimento celular nas duas linhagens de células tumorais testadas. Porém, o 5-FU carregado nas nanopartículas apresentou baixo efeito citotóxico contra as linhagens celulares neoplásicas testadas, até a maior concentração testada, semelhante aos resultados também obtidos em nosso estudo.

Fidelis et al. (2021) avaliaram em células de câncer de pele do tipo melanoma (B16F10), e em células saudáveis (NIH/3T3), a citotoxicidade da temozolamida (TMZ) e da NPAu isoladamente e associadas. A TMZ isolada, mesmo na concentração mais alta utilizada, não apresentou mais de 30% de citotoxicidade nas células B16F10, em um tempo de incubação

de 72 horas. Em relação as concentrações utilizadas, nenhuma apresentou citotoxicidade significativa em células NIH3T3, em nenhum dos períodos de incubação. Estes resultados são semelhante aos encontrados em nosso estudo quando avaliado o 5-FU de maneira isolada, tanto em células tumorais quanto em células saudáveis.

Foram ainda avaliados no estudo de Fidelis et al. (2021) a citotoxicidade em relação a associação do medicamento TMZ com a NPAu, denominada de TNPAu. Quando a viabilidade celular foi avaliada nas células saudáveis da linhagem NIH/3T3, a solução de TNPAu em geral não apresentou citotoxicidade significativa, mostrando assim que a associação avaliada não causou morte significativa de células saudáveis. Em relação a ação da TNPAu em células tumorais de melanoma da linhagem B16F10, independente do tamanho das nanopartículas utilizadas houve citotoxicidade em praticamente todas as concentrações. Estes resultados encontrados são semelhantes aos encontrados em nosso estudo quando avaliamos a associação de 5-FU associado a NPAu tanto em células saudáveis como em células tumorais, resultados estes que corroboram para a idéia de sinergia entre a combinação utilizada, quando uma substância reforça a ação do outro.

Esses resultados de diferentes estudos citados acima evidenciam o fato de que, a citotoxicidade de nanopartículas em diferentes linhagens celulares é variável e essa variabilidade se deve ao tipo de linhagem celular, tamanho de partícula, carga superficial, concentrações utilizadas, tempo de exposição e revestimento de partículas (Rafiei et al., 2016). O uso de NPAu no tratamento dos tumores é hoje considerada uma estratégia potencial para o tratamento do câncer (Sztandera et al., 2019). No entanto, uma vez que os mecanismos de citotoxicidade das NPAu não são totalmente conhecidos e caracterizados, seu uso como tratamento para tumores ainda necessita de mais estudos e pesquisas na área.

Considerando que a toxicidade hematológica dos medicamentos utilizados atualmente para tratamento do câncer é um dos principais fatores responsáveis pela suspensão do tratamento oncológico, e que a associação desses fármacos com NPAu pode possibilitar a redução da dosagem necessária do medicamento e sua toxicidade, foi realizado a análise da hemotoxicidade do 5-FU, tanto isoladamente quanto em combinação com NPAu (Ouyang et al., 2013).

Estas toxicidades causadas por NPAu e por quimioterápicos podem diminuir a produção dos glóbulos vermelhos causando anemia, reduzir os glóbulos brancos levando a neutropenia ou granulocitopenia, com risco aumentado de infecções com foco desconhecido, e levar ainda a queda de plaquetas ocasionando a trombocitopenia, que podem causar

sangramentos. Todas estas circunstâncias podem ter desfechos fatais, levando o paciente a óbito (Ouyang et al., 2013).

Neste estudo, o 5-FU isolado, a NPAu isolada e a associação de ambos, nas concentrações testadas, não apresentaram hemotoxicidade nem qualquer outro efeito adverso avaliado. Em relação as NPAu, o estudo de Della Vechia et al. (2020) demonstrou que NPAu de 20 nm utilizadas causaram danos hemolíticos apenas em concentrações mais elevadas. Nas concentrações abaixo de 20 µg/mL as NPAu de 20 nm não causaram nenhum dano aos eritrócitos humanos, resultado que coincide com o encontrado em nosso estudo na avaliação de NPAu de igual tamanho.

Semelhantes resultados de hemocompatibilidade foram encontrados também em estudo realizado por Foo et al. em 2017, que demonstrou que a NPAu sintetizados a partir do extrato de *Curcuma mangga* são hemocompatíveis. Não mais do que 10% de hemólise foi observado para todas as concentrações testadas de até 50 mcg/mL, que está abaixo da razão hemolítica segura para biomateriais de acordo com a ISO/TR7406. A agregação de hemácia também não foi observada para todas as concentrações de NPAu testadas.

No estudo de Fidelis (2021) a TMZ, nas concentrações testadas, apresentou apenas uma pequena citotoxicidade na concentração de 35 µg/mL, não sendo esta significativa. Nas demais concentrações, tanto o medicamento isolado como associado as nanopartículas não apresentaram danos aos eritrócitos humanos. Resultado este também semelhante aos encontrados em nosso estudo com 5-FU e NPAu.

Apesar de relatos na literatura apontarem que o 5-FU pode causar anemia hemolítica em certas condições, os resultados do presente estudo não indicaram atividade hemolítica nas culturas celulares avaliadas. Essa diferença pode estar relacionada ao modelo experimental utilizado, uma vez que culturas celulares *in vitro* não reproduzem completamente a complexidade do ambiente fisiológico presente no organismo. No contexto clínico, a hemólise induzida pelo 5-FU pode ocorrer por mecanismos imunomediados ou por efeitos diretos sobre a membrana dos eritrócitos, processos que envolvem interações sistêmicas e a presença de fatores imunológicos, os quais não estão presentes em sistemas de cultura celular (Sandvei et al., 1987; Yürek et al., 2010). Além disso, a ausência de células do sistema imune e a falta de fluxo sanguíneo podem limitar a reprodução exata dos efeitos hematológicos observados em pacientes (Sandvei et al., 1987; Yürek et al., 2010). Portanto, estudos adicionais empregando modelos mais complexos, como ensaios *in vivo* ou culturas celulares em sistemas tridimensionais, poderiam fornecer informações mais precisas sobre o impacto do 5-FU na

viabilidade eritrocitária e seu potencial hemolítico (Congrains et al., 2021).

A última etapa do estudo consistiu na realização do ensaio cometa, utilizado para avaliar o percentual de danos e quebras no material genético celular. O grupo controle apresentou níveis mínimos de dano ao DNA, possivelmente devido à alta eficiência do sistema de reparo celular das células Caco-2, característica comum a células neoplásicas. Embora, de forma geral, os resultados tenham indicado baixos percentuais de dano ao DNA, a dose de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de 5-FU associado à NPAu se destacou por causar um aumento significativo nesse tipo de lesão nas células tumorais Caco-2. Esse achado é particularmente relevante, pois essa mesma concentração também apresentou significância estatística no ensaio de MTT em relação à citotoxicidade, sugerindo uma correlação entre o aumento na genotoxicidade e na redução da viabilidade celular.

Cardoso et al. (2014) realizaram um estudo sintetizando e caracterizando NPAu com diâmetros médios de 10 e 30 nm, avaliando parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo e dano ao DNA no cérebro de ratos adultos submetidos à administração aguda e crônica. O estudo concluiu que as NPAu induziram altos níveis de dano ao DNA em ambas as condições, sendo que os danos causados pela administração crônica foram significativamente maiores do que os observados na administração aguda, demonstrando que o dano ao DNA ocorreu de forma distinta para cada estrutura avaliada, dependendo do tamanho das nanopartículas e/ou do regime de administração. Essa variabilidade também foi observada em nosso estudo, especialmente em relação às diferentes dosagens utilizadas e à associação do medicamento com a NPAu.

Silva et al. (2020) avaliaram o potencial genotóxico de nanopartículas metálicas em células de pulmão humano *in vitro*, analisando os danos no DNA pelo Ensaio do Cometa. Os resultados indicaram um efeito genotóxico significativo nas concentrações mais altas (1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$), com uma elevada taxa de dano de classe 3 nessas condições. Em contraste, nosso estudo demonstrou um aumento no dano celular nos grupos tratados com 5-FU, isolado ou em combinação com NPAu, porém, na maioria dos casos, sem diferenças estatisticamente significativas. Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de utilizarmos células tumorais, que possuem uma alta capacidade de reparo do DNA, o que pode minimizar os danos genéticos induzidos pelos tratamentos.

Dessa forma, os resultados deste estudo reforçam o potencial das NPAu como uma estratégia inovadora para a entrega do 5-FU no tratamento oncológico. A modulação das propriedades físico-químicas das NPAu permitiu uma melhor interação com o fármaco,

resultando em maior eficácia citotóxica contra células tumorais e menor toxicidade para células saudáveis. Esses resultados encontrados estão alinhados com pesquisas recentes que destacam o papel das nanotecnologias na otimização de terapias oncológicas, oferecendo novas possibilidades para tratamentos mais seletivos e eficazes. No entanto, estudos adicionais são essenciais para validar esses efeitos em modelos mais complexos, como ensaios *in vivo*, bem como para investigar a biodistribuição e os possíveis impactos a longo prazo dessa abordagem terapêutica.

6 CONCLUSÃO

O tratamento de pacientes com neoplasias malignas continua sendo um desafio na área de saúde, devido à complexidade dos mecanismos das células tumorais, que permanecem em grande parte desconhecidos. A toxicidade e os efeitos adversos dos tratamentos convencionais agravam ainda mais esse cenário, tornando o manejo clínico mais difícil. Contudo, os avanços da nanotecnologia vêm ao encontro destas dificuldades, oferecendo novas possibilidades terapêuticas e renovando as perspectivas para pacientes e suas famílias.

Os resultados obtidos indicam que a combinação de 5-FU com NPAu pode representar uma estratégia promissora para o tratamento oncológico, promovendo uma maior citotoxicidade seletiva para as células tumorais e reduzindo os danos em células saudáveis. Essa abordagem pode contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos agressivas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. Contudo, é fundamental que novos estudos sejam realizados para aprofundar a investigação do potencial terapêutico dessa associação, principalmente para aprimorar a compreensão dos mecanismos de interação entre esses compostos e avaliar sua eficácia em modelos *in vivo*, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na oncologia.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, R. V. B. F. **Rastreamento e vigilância do câncer colorretal: Guidelines mundiais**. GED - Gastreenterologia Endoscopia Digestiva, v. 30, n. 2, p. 62–74, 2011. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-639267>. Acesso em: 12 nov. 2024.
- BANSAL, A. S. *et al.* **Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications**. *Nanoscale Advances*, v. 2, n. 9, p. 3764–87, 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/na/d0na00472c>. Acesso em: 09 jan. 2025.
- BEHERA, S. *et al.* **UV-visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation**. *J Anal Bioanal Techniques*, v. 3, n. 6, p. 151-7, 2012. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/uvvisible-spectrophotometric-method-development-and-validation-of-assay-of-paracetamol-tablet-formulation-2155-9872.1000151.php?aid=7430>. Acesso em: 06 dez. 2024.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. **Tumorigenesis and the angiogenic switch**. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 6, p. 401–10, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1093>. Acesso em: 10 fev. 2025.
- BISHT, G.; RAYAMAJHI, S. **ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent**. *Nanobiomedicine*, v. 3, n. 9, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.5772/64138>. Acesso em: 12 nov. 2024.
- BLASCHKE, M. *et al.* **Measurement of 5-FU plasma levels in patients with advanced cancer: correct approach to practical procedures is essential**. *Int J Clin Pharmacol Ther*, v. 49, n. 1, p. 83-5, 2011. Disponível em: <https://www.dustri.com/nc/journals-in-english/mag/int-journal-of-clinical-pharmacology-and-therapeutics/vol/vol-49/issue/january-1.html>. Acesso em: 20 nov. 2024
- BREDA, M.; BARATTÈ, S. **A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices**. *Anal Bioanal Chem*, v. 397, n. 3, p. 1191-201, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-3641-1>. Acesso em: 25 set. 2024
- BRUNTON, L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMAN, B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2019. p. 1425-77. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/goodman-and-gilmans-the-pharmacological-basis-of-therapeutics/brunton/978-1-25-958473-2>. Acesso em: 10 fev. 2025.
- CAPELL, M. S. **Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer**. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 37, n. 1, p. 1–24, 2008. Disponível em: [https://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553\(07\)00092-3/fulltext](https://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553(07)00092-3/fulltext). Acesso em: 15 out. 2024.

CARDOSO, É. **Efeitos da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos em cérebro de ratos**. 2014. 112 f. Tese (Doutorado) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2014. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/handle/1/2529>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CARVALHO LOPES, J.; PETREIRA TORRES, M. L. **Utilização de Nanopartículas no Tratamento do Câncer: Aspectos Gerais, Mecanismos de Ação Antineoplásicos e Aplicabilidades Tumorais**. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 65, n. 4, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/1873>. Acesso em: 15 jan. 2025.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. **Chemotherapy and the war on cancer**. Nature Reviews Cancer, v. 5, n. 1, p. 65–72, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1529>. Acesso em: 23 jan. 2025

CHAVES, L. S. **Nanopartículas de quitosana e carragenanas: produção, caracterização e avaliação preliminar como sistema de liberação controlada de 5-fluorouracil**. 2013. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/18832/1/2013_tese_Ischaves.pdf?. Acesso em: 08 dez. 2024.

CLAYTON, K. N. *et al.* **Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry**. Biomicrofluidics, v. 10, n. 5, p. 054107, 2016. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4963194>. Acesso em: 18 nov. 2024

COLLINS, A. *et al.* **Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols**. Nat Protoc., v. 18, n. 3, p. 929-989, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41596-022-00738-5>. Acesso em: 03 out. 2024.

CONGRAINS A, *et al.* **3D Scaffolds to Model the Hematopoietic Stem Cell Niche: Applications and Perspectives**. Materials, vol. 14, n. 3, p. 569, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma14030569>. Acesso em: 21 nov. 2024.

CUESTA, A. J. P.; GARCÍA-ALONSO, J. L. M.; GÓMEZ-MARTÍN, J. L. **The Role Of Surgical Resection In Colorectal Cancer**. Surgical Oncology, v. 26, n. 3, p. 161-169, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960740412000340>. Acesso em: 24 nov. 2024.

DA RÓZ, Alessandra Luzia; LEITE, Fábio de Lima; FERREIRA, Marystela; OLIVEIRA JÚNIOR, Osvaldo Novais de (orgs.). **Nanoestruturas: princípios e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 278 p. (Coleção Nanociência e Nanotecnologia: Princípios e Aplicações, v. 1). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/272175367_Nanociencia_Nanotecnologia_Principios_e_Aplicacoes_Nanoestruturas. Acesso em: 11 set. 2024.

DAL BÓ, A. G. *et al.* **Synthesis, micellization and lectin binding of new glycosurfactants**. Carbohydr. Res., v. 397, p. 31–36, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25193382/>. Acesso em: 11 set. 2024.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. **To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery.** *Journal of Controlled Release*, v. 148, n. 2, p. 135–46, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20797419/>. Acesso em: 12 jan. 2025

DARWEESH, R. S.; AYOUB, N. M.; NAZZAL, S. **Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications.** *Int J Nanomedicine*, v. 14, p. 7643-7663, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6799360/>. Acesso em: 15 jan. 2025

DE ANGELIS, P. M.; SVENDSRUD, D. H. **Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery.** *Molecular Cancer*, v. 5, n. 20, p. 1–25, 2006. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-5-20>. Acesso em: 12 ago. 2024

DELLA VECHIA, I. C. *et al.* **Comparative cytotoxic effect of citrate-capped gold nanoparticles with different sizes on noncancerous and cancerous cell lines.** *J Nanopart Res.*, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-020-04801-0>. Acesso em: 18 ago. 2024.

DEVITA, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSEMBERG, A. S. **Principles and Practice of Oncology.** 10. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2021. p. 208-217. Disponível em: <https://shop.lww.com/Principles-and-Practice-of-Oncology/p/9781451192940>. Acesso em: 22 jul. 2024

DISNER, G. R.; CESTARI, M. M. **Nanociência e nanotecnologia.** *Evidencia*, v. 16, n. 1, p. 71–76, 2016. Disponível em: <https://revistas.unicentro.br/index.php/evidencia/article/view/3940>. Acesso em: 17 jan. 2024.

DOS SANTOS, M. C. *et al.* **Elucidating Bauhinia variegata lectin/phosphatidylcholine interactions in lectin-containing liposomes.** *J. Colloid Interface Sci.*, v. 519, p. 232–241, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718302070>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DOS SANTOS, M. C. *et al.* **Self-assembled carbohydrate-based vesicles for lectin targeting.** *Colloids and Surf. B.*, v. 148, p. 12–18, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776516300020>. Acesso em: 16 nov. 2024.

DUNCAN, B.; KIM, C.; ROTELLO, V. M. **Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems.** *Journal of Controlled Release*, v. 148, n. 1, p. 122–27, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836591000002X>. Acesso em: 20 set. 2024.

ELBIALY, N. S.; FATHY, M. M.; KHALIL, W. M. **Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery.** *Int J Pharm.*, v. 490, n. 1-2, p. 190-9,

2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25997662/>. Acesso em: 06 dez. 2024.

FAN, W.; YUNG, B.; HUANG, P.; CHEN, X. **Nanotechnology for multimodal synergistic cancer therapy**. *Chem Rev.*, v. 117, n. 22, p. 13566-13638, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29048884/>. Acesso em: 25 nov. 2024.

FANG, R. H.; KROLL, A. V.; ZHANG, L. **Nanoparticle-Based Manipulation of Antigen-Presenting Cells for Cancer Immunotherapy**. *Small*, v. 11, n. 41, p. 5483–96, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml.201501772>. Acesso em: 23 jan. 2025

FEUSER, P. E. *et al.* **Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells**. *European Polymer Journal*, v. 68, p. 355–65, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305715003000>. Acesso em: 16 set. 2024.

FIDELIS, G. S. P. **Avaliação da citotoxicidade da temozolomida associada a nanopartículas de ouro em linhagem celular de câncer de pele do tipo melanoma**. 2021. 76 p. Tese (Doutorado) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2021. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/handle/1/7748>. Acesso em: 28 nov. 2024. 25 nov. 2024.

FIGAT, A. M. *et al.* **α -Amino acids as reducing and capping agents in gold nanoparticles synthesis using the Turkevich method**. *Langmuir*, v. 39, n. 25, p. 8646-8657, 2023. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.3c00678>. Acesso em: 10 jan. 2025.

FOO, Y. Y. *et al.* **Curcuma mangga-mediated synthesis of gold nanoparticles: Characterization, stability, cytotoxicity, and blood compatibility**. *Nanomaterials*, v. 7, n. 6, p. 123, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/7/6/123>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FYTIANOS, K. *et al.* **Uptake efficiency of surface modified gold nanoparticles does not correlate with functional changes and cytokine secretion in human dendritic cells in vitro**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 11, n. 3, p. 633–44, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963414005000>. Acesso em: 22 jul. 2024.

GAO, P. *et al.* **Synergistic integration of metal nanoclusters and biomolecules as hybrid systems for therapeutic applications**. *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, v. 11, n. 5, p. 1175–99, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34094827/>. Acesso em: 27 jul. 2024.

GOKARE, P.; FINNBERG, N. K. **P53 represses pyrimidine catabolic gene dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) expression in response to thymidylate synthase (TS) targeting**. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09859-x>. Acesso em: 18 ago. 2024.

HAINFEKD, J. F. *et al.* **Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma.** *Physics in Medicine and Biology*, v. 55, n. 11, p. 3045–59, 2010. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/55/11/004>. Acesso em: 23 set. 2024.

HAN, J. W.; GURUNATHAN, S.; CHOI, Y. J.; KIM, J. H. **Dual functions of silver nanoparticles in F9 teratocarcinoma stem cells, a suitable model for evaluating cytotoxicity- and differentiation-mediated cancer therapy.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 7529–49, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627500/>. Acesso em: 18 set. 2024.

HAUPENTHAL, D. P. D. S. *et al.* **Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice.** *Journal of Drug Targeting*, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 1-9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1634445>. Acesso em: 01 nov. 2024.

HUANG, X.; JAIN, P. K.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. **Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy.** *Nanomedicine (Lond)*, v. 2, n. 5, p. 681-93, 2007. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17435889.2.5.681>. Acesso em: 15 jan. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2021-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 18 nov. 2024.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** Geneva: ISO, 2009. Disponível em: <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2024.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TR 7406:1986 – Bore type milling cutters for indexable inserts - Designation.** Geneva: ISO, 1986. Disponível em: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/14135/e51a3eca06f847b3992c005e0ad9ac26/ISO-7406-1986.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2024.

JURJ, A. *et al.* **The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment.** *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, p. 2871–90, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5557550/>. Acesso em: 12 ago. 2024.

KHAN, F. A.; ALDAHAN, R.; ALMOHAZEY, D. **Impact of gold nanoparticles on colon cancer treatment and diagnosis.** *Nanomedicine*, v. 16, n. 10, p. 779–782, 2021.

Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nmm-2021-0123>. Acesso em: 11 out. 2024.

KIMLING, J. *et al.* **Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited.** The Journal of Physical Chemistry B., v. 110, n. 32, p. 15700-15707, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp061667w>. Acesso em: 28 set. 2024.

KOUKOURAKIS, G. V. **Capecitabine for locally advanced and metastatic colorectal cancer: A review.** World Journal of Gastrointestinal Oncology, v. 2, n. 8, p. 311-22, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2999157/>. Acesso em: 07 jan. 2025.

KUMAR, D.; SAINI, N.; JAIN, N. **Gold nanoparticles: An era in bionanotechnology.** Expert Opinion on Drug Delivery, v. 10, n. 3, p. 397-409, 2013. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.2013.752818>. Acesso em: 11 jan. 2025.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. **5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.** Nature Reviews Cancer, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc1074>. Acesso em: 22 set. 2024.

MALLET-MARTINO, M.; MARTINO, R. **Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review.** Oncologist, v. 7, n. 4, p. 288-323, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/oncolo/article/7/4/288/6386799>. Acesso em: 28 out. 2024.

MATTOS, A. C. de. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UCEN_12f8e9b3acf583d2da5636387ad6626e. Acesso em: 21 jun. 2024.

MATUO, Renata. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta aos danos no DNA induzidos pelo agente antitumoral 5-fluorouracil.** 2012. 278 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/49288/000827929.pdf>. Acesso em: 13. Jun 2024.

MICHELETTO, Y. M. S. *et al.* **Investigation of self-association between new glycosurfactant N-acetyl- β -d-glucosaminyl-PEG-docosanate and soybean phosphatidylcholine into vesicles.** Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp., v. 467, p. 166-172, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/269728574_Investigation_of_self-association_between_new_glycosurfactant_N-acetyl-b-d-glucosaminyl-PEG-docosanate_and_soybean_phosphatidylcholine_into_vesicles. Acesso em: 08 jun. 2024.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. **Nanoparticles – a review**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 5, p. 561-573, 2006. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/14634>. Acesso em: 22 ago. 2024.

MØLLER, P. *et al.* **Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results**. Nature Protocols, v. 15, n. 12, p. 3817-3826, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>. Acesso em: 15 jan. 2025.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. **DNA methylation and its basic function**. Neuropsychopharmacology, v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/npp2012112>. Acesso em: 19 jun. 2024.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso em: 08 fev. 2025.

MOSQUERA, V. X. *et al.* **Gold nanorod-based nanohybrids for combinatorial therapeutics**. ACS Omega, v. 3, n. 10, p. 12633–647, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.8b01820>. Acesso em: 15 out 2024.

NAGORE, E.; INSA, A.; SANMARTIN, O. **Antineoplastic therapy induced palmar plantar erythrodysesthesia (hand-foot) syndrome**. American Journal of Clinical Dermatology, v. 1, n. 4, p. 225–34, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165/00128071-200001040-00004>. Acesso em: 18 dez. 2024.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Compound Summary for CID 3385, 5-Fluorouracil**. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorouracil>. Acesso em: 08 jun. 2024.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. **Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea**. Química Nova, v. 34, n. 3, p. 408-13, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/DK4XCLgmQWFXTMjhwvJnGBp/>. Acesso em: 18 out. 2024.

NOORDHUIS, P. *et al.* **5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers**. Annals of Oncology, v. 15, n. 7, p. 1025–32, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/annonc/article/15/7/1025/166901>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ORZA, A. *et al.* **Reversing chemoresistance of malignant glioma stem cells using gold nanoparticles**. Int J Nanomedicine, v. 8, p. 689-702, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589121/>. Acesso em: 08 jun. 2024.

OUYANG, Z.; PENG, D.; DHAKAL, D. P. **Risk factors for hematological toxicity of chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma**. Oncology Letters, v. 5, n. 5, p. 1736-

1740, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3678576/>. Acesso em: 21 jun. 2024

PETERS, G. J. *et al.* **Thymidylate synthase and drug resistance**. *European Journal of Cancer*, v. 31, n. 7-8, p. 1299–305, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7576993/>. Acesso em: 15 jun. 2024.

PETRELLI, F.; CABIDDU, M.; BARNI, S. **5-Fluorouracil or capecitabine in the treatment of advanced colorectal cancer: A pooled-analysis of randomized trials**. *Medical Oncology*, v. 29, n. 2, p. 1020–29, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21394595/>. Acesso em: 07 ago. 2024.

RAFIEL, S. *et al.* **Gold Nanoparticles Impair Foot-and-Mouth Disease Virus Replication**. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, v. 15, n. 1, p. 34-40, 2016. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7381864>. Acesso em: 29 ago. 2024.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.; HENDERSON, G.; MacEWAN, D.; LOKE, Y. K. **Farmacologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. p. 716-729.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. **Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas**. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 43, n. 2, p. 94–101, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/y47Yjzv8f63T6h6FrJyS5Tt>. Acesso em: 17 dez. 2024.

SANDVEI P; NORDHAGEN R; MICHAELSEN TE; WOLTHUIS K. **Fluorouracil (5-FU) induced acute immune haemolytic anaemia**. *British Journal of Haematology*, v. 65, n. 3, p. 357–359, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1987.tb06868.x>. Acesso em: 15 set. 2024.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. *Quim. Nova.*, v. 26, p. 726-737, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/sjkQhvTyn78qtr8SnmkdVgC>. Acesso em: 07 jan. 2025.

SHEN, B.; ZHAO, K.; MA, S.; YUAN, D.; BAI, Y. **Topotecan-loaded mesoporous silica nanoparticles for reversing multi-drug resistance by synergetic chemoradiotherapy**. *Chemistry - An Asian Journal*, v. 10, n. 2, p. 344-8, 2015. Disponível em: <https://aces.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/asia.201403117>. Acesso em: 18 jan. 2025.

SHEN, Y. *et al.* **Epigenomics alterations and dynamic transcriptional changes in responses to 5-fluorouracil stimulation reveal mechanisms of acquired drug resistance of colorectal cancer cells**. *Pharmacogenomics Journal*, v. 18, n. 1, p. 23–28, 2018. Disponível em: Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28120898/>. Acesso em: 12 jul. 2024.

SILVA, E.; MATSUMOTO, S. **Avaliação dos potenciais citotóxicos e genotóxicos das amostras de nanopartículas metálicas por meio de ensaios em células de pulmão humana *in vitro***. *Anais da Semana de Biologia da UFES de Vitória*, v. 1, p. 30-30, 2020.

Disponível em: <https://periodicos.ufes.br/sebivix/article/view/31073>. Acesso em: 19 jun. 2024.

SINGH, P. *et al.* **Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 7, p. 1-16, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/1979>. Acesso em: 08 jan 2025.

SUDHAKAR, A. **History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods**. *Journal of Cancer Science & Therapy*, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2009. Disponível em: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/history-of-cancer-ancient-and-modern-treatment-methods-1948-5956.100000e2.pdf>. Acesso em: 21 jul 2024.

SZTANDERA, K.; GORZKIEWICZ, M.; KLAJNERT-MACULEWICZ, B. **Gold nanoparticles in cancer treatment**. *Mol Pharm.*, v. 16, n. 1, p. 1-23, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00810>. Acesso em: 15 ago. 2024.

TAO, Y.; LI, M.; REN, J.; QU, X. **Metal nanoclusters: novel probes for diagnostic and therapeutic applications**. *Chemical Society Reviews*, v. 44, n. 23, p. 8636-63, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cs/c5cs00607d>. Acesso em: 17 ago. 2024.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. **A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold**. *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55–75, 1951. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>. Acesso em: 08 set. 2024.

UGGIONI, M. L. R. *et al.* **Efeito sinérgico de paclitaxel e cisplatina associado com nanopartículas de ouro em células cervicais Hela**. *Ouro Touro*, v. 55, n. 1, p. 65-75, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13404-021-00305-5>. Acesso em: 15 de ago.2024.

VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G.; HOLOHAN, C. **Cancer drug resistance: An evolving paradigm**. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 10, p. 714–26, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3599>. Acesso em: 09 jan. 2025.

VIEIRA, Débora Braga; GAMARRA, Lionel Fernel. **Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer**. *Einstein (São Paulo)*, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016. Disponível em: <https://journal.einstein.br/article/avancos-na-utilizacao-de-nanocarreadores-no-tratamento-e-no-diagnostico-de-cancer/>. Acesso em: 15 jan. 2025

WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. **Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments**. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 12, p. 3855–64, 2018. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/3855-3864.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2025.

WINAWER, S. J. **Natural history of colorectal cancer**. American Journal of Medicine, v. 106, n. 1A, p. 3S-6S, 1999. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10089106/>. Acesso em: 01 fev. 2025

YCHOU, M. *et al.* **Individual 5-FU dose adaptation in metastatic colorectal cancer: results of a phase II study using a bimonthly pharmacokinetically intensified LV5FU2 regimen**. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, v. 52, n. 4, p. 282-90, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0641-2>. Acesso em: 12 ago. 2024.

YÜREK S; RIESS H; KREHER S; DORKEN B; SALAMA A. **Fatal immune haemolysis due to antibodies to individual metabolites of 5-fluorouracil**. Transfusion Medicine, v. 20, n. 4, p. 265–268, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2010.01009.x>. Acesso em: 04 out. 2024.

ZHANG, C. *et al.* **The Impact of the Expression Level of Intratumoral Dihydropyrimidine Dehydrogenase on Chemotherapy Sensitivity and Survival of Patients in Gastric Cancer: A Meta-Analysis**. Disease Markers, v. 2017, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/9856215>. Acesso em: 08 dez. 2024.

ZHENG, Y.; HUNTING, J.; AYOTTE, P.; SOURCE, L. S. **Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons**. Radiation Research, v. 169, n. 4, p. 481–82, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1667/RR1101.1>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZOU, L. *et al.* **Current approaches of photothermal therapy in treating cancer metastasis with nanotherapeutics**. Theranostics, v. 6, n. 6, p. 762–72, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/thno.14654>. Acesso em: 15 jul. 2024.