

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE MESTRADO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MAURICIO LAWRENCE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO DE
TRÊS TAMANHOS DIFERENTES EM CÉLULAS DE LINHAGENS
CANCERÍGENAS E NÃO CANCERÍGENAS**

CRICIÚMA, SC

2020

MAURICIO LAWRENCE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO DE
TRÊS TAMANHOS DIFERENTES EM CÉLULAS DE LINHAGENS
CANCERÍGENAS E NÃO CANCERÍGENAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado
de Ávila.

Coorientador: Dr. Paulo Emilio Feuser

**CRICIÚMA, SC
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F866a Freitas, Mauricio Lawrence.

Avaliação da biocompatibilidade de nanopartículas de ouro de três tamanhos diferentes em células de linhagens cancerígenas e não cancerígenas / Mauricio Lawrence Freitas. - 2020.

46 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientação: Paulo Emilio Feuser.

1. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 2. Câncer - Tratamento. 3. Fibroblastos murinos. 4. Células de carcinoma cervical humano. 5. Células de melanoma. I. Título.

CDD 23. ed. 616.994

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



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

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 368

Com início às 09h (nove horas) do dia nove de outubro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MAURICIO LAWRENCE FREITAS**, sob a orientação do **Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila** e coorientação do **Prof. Dr. Paulo Emilio Feuser** intitulada **“AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO DE TRÊS TAMANHOS DIFERENTES EM CÉLULAS DE LINHAGENS CANCERÍGENAS E NÃO CANCERÍGENAS”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h (dez horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 09 (nove) de outubro de 2020 (dois mil e vinte).

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a Resolução n. 7/2015 do Colegiado de
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Este trabalho foi elaborado no Laboratório de Fisiopatologia Experimental do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo
Sul Catarinense – UNESC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e à minha esposa Flávia pelo auxílio e compreensão.

Ao UNESC Colatina na pessoa do meu amigo Hélio Angotti, que me incentivou a iniciar esta tarefa.

Aos colegas do mestrado, aos colegas e amigos que fiz em Criciúma pela grande ajuda e disponibilidade que tiveram durante este período..

Aos meus orientadores, em especial ao prof. Ricardo Andrez e o prof Paulo Feuser, pela disponibilidade e auxílio na superação das dificuldades surgidas.

A todos os outros que disponibilizaram parte do seu tempo e trabalho para a finalização desta tarefa.

Obrigado Rahisa!!

RESUMO

As nanopartículas de ouro (GNPs) possuem propriedades que podem ser aplicadas no diagnóstico e no tratamento do câncer, melhorando tanto o controle quanto a eficiência do tratamento. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar GNPs com diferentes tamanhos e avaliar sua citotoxicidade em eritrócitos humanos, fibroblastos murinos (NIH3T3), células de carcinoma cervical humano (HeLa) e células de melanoma (B16F10). As GNPs foram sintetizadas com sucesso pelo método de Turkevich, obtendo-se GNPs com diferentes tamanhos (10, 20 e 30 nm). Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as GNPs apresentaram uma morfologia esférica (GNPs 10nm) e próxima da esférica (GNPs 20 nm e 30 nm) com tamanho próximo do esperado. Os tamanhos das GNPs foram confirmados por análise de espectroscopia de ultravioleta-visível. Estudos de citotoxicidade mostraram que as GNPs de 20 nm apresentaram um menor efeito citotóxico sob as células não tumorais, quando comparado com as outras GNPs. Em contraste, quando as GNPs foram incubadas em células B16F10, as GNPs de 10 nm foram mais citotóxicas do que os de 20 e 30 nm. O ensaio de citotoxicidade também mostrou que as células HeLa foram mais sensíveis ($IC_{50} 2,1 \mu\text{g} / \text{mL}$) ao tratamento com as GNPs quando comparada com as células B16 ($IC_{50} > 70 \mu\text{g} / \text{mL}$). Portanto, este estudo demonstrou que as propriedades físico-químicas e o tipo de célula utilizada são fatores limitantes no efeito citotóxico das GNPs. Esses resultados confirmam a necessidade de estudos futuros com diferentes linhagens celulares para melhor compreender os efeitos citotóxicos a fim de desenvolver novas terapias contra o câncer.

Palavras-chave: citotoxicidade, câncer; nanopartículas de ouro; eritrócitos, B16F10, HeLa, NIH3T3

ABSTRACT

Gold nanoparticles (GNPs) have properties that can be applied to the diagnosis and therapies of cancer, improving both the control and efficiency of treatment. Therefore, the aim of this study was to synthesize and characterize GNPs of different sizes and evaluate their cytotoxicity in human erythrocytes, murine fibroblasts (NIH3T3), human cervix carcinoma cells (HeLa), and melanoma cells (B16F10). GNPs were successfully synthesized by the Turkevich method, to obtain GNPs with different sizes (10, 20 and 30 nm). Transmission electron microscopy images showed GNPs with spherical/near-spherical morphology and their sizes were confirmed by ultraviolet-visible spectroscopy analysis. Cytotoxicity studies showed that the 20 nm GNPs exerted lower cytotoxic effects on noncancerous cells than other GNPs and presented a higher cytotoxic effect on HeLa cells. In contrast, when GNPs were incubated with B16F10 cells, the 10 nm GNPs were more cytotoxic than the 20 and 30 nm GNPs. The cytotoxicity assay also showed that the HeLa cells were more sensitive (IC_{50} 2.1 $\mu\text{g/mL}$) to treatment with GNPs than B16 cells (IC_{50} >70 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, this study demonstrated that the physicochemical properties and cell type used are limiting factors in the cytotoxic effect of GNPs. Lastly, these results confirm the need for future studies with different cell lines to better understand the cytotoxic effects in order to develop novel cancer therapies.

Keywords: cytotoxicity; cancer; gold nanoparticles; erythrocytes; B16F10; HeLa; NIH3T3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Propriedades importantes das nanopartículas de ouro.....	13
Figura 2 - Estágios do melanoma cutâneo.....	16
Figura 3 - Fluxograma ilustrando todas as etapas da síntese de GNPs	22
Figura 4 - Imagens MET e espectros de UV-Visde de soluções de GNP.	26
Figura 5 - FTIR (a) e DXR (b) espectros de GNPs de 10, 20, and 30 nm.	27
Figura 6 - Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos incubados com GNPs	28
Figura 7 - Citotoxicidade <i>in vitro</i> de soluções de GNPs nas células NIH 3T3.	29
Figura 8 - Citotoxicidade <i>in vitro</i> de soluções de GNPs nas células HeLa.	30
Figura 9 - Citotoxicidade <i>in vitro</i> de soluções de GNPs nas células B16F10.	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 NANOTECNOLOGIA	11
1.1.1 Nanopartículas de ouro	12
1.2 CÂNCER.....	13
1.2.1 Câncer de pele do tipo melanoma	14
1.2.2 Câncer cervical.....	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAIS	21
3.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	21
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	22
3.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	22
3.3.2 Diâmetro Médio das Nanopartículas	23
3.3.3 Potencial Zeta.....	23
3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	23
3.3.5 Difração de Raio – X.....	23
3.4 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	24
3.4.1 Ensaio de hemólise.....	24
3.4.2 Ensaio de citotoxicidade	24
3.4.3 Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPs.....	26
4.2 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	27
4.2.1 Ensaio de hemólise.....	27
4.2.2 Ensaio de citotoxicidade em células não cancerígenas NIH 3T3	29
4.2.3 Ensaio de citotoxicidade em células cancerígenas HeLa	29
4.2.4 Ensaio de citotoxicidade em células cancerígenas B16F10	30
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA

Na última década, vários estudos sobre novos nanomateriais tem apresentado relevância no mundo devido às suas propriedades químicas, físicas e biológicas únicas. Além disso, essas novas tecnologias apresentam uma ampla variedade de aplicações biomédicas, como por exemplo, no diagnóstico e tratamento de câncer (Cai, 2008; Puri et al., 2009; Lungu et al., 2019; Habibi et al., 2020).

A expressão nanomateriais advém da palavra “nano” que tem origem grega e se refere a um tamanho mil vezes menor que um micrón (Mansoori, 2002). Desta forma, nanotecnologia, uma ciência transdisciplinar, vem estudando a manipulação e utilização de diversos materiais em escala nanométrica (1 e 100 nanômetros). Através de diversas pesquisas, foi possível demonstrar que as características físico-químicas, eletrônicas, magnéticas, ópticas, mecânicas e comportamentais dos nanomateriais são diferentes daquelas apresentadas quando a matéria encontra-se em escala maior (Rossi-Bergmann, 2008; Raghavendra et al., 2014). Estes materiais são considerados como localizados “na fronteira dos menores dispositivos feitos pelo homem e as menores moléculas de sistemas vivos” (Mansoori, 2002).

Desta forma, para a utilização desses nanomateriais no campo da medicina é necessária a compreensão dos mecanismos neles propostos, como: a interação do nanomaterial ou nanocomposto com as células a nível celular e molecular, sua biodistribuição e metabolização, as possíveis vias de administração, sua toxicidade e a faixa terapêutica adequada para o objetivo proposto (Arvizo et al., 2012).

As nanopartículas podem ser constituídas de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, conferindo um amplo potencial de aplicabilidade devido às suas inúmeras possíveis formas (Martinelli et al., 2019). As nanopartículas de metais nobres possuem a capacidade de emitir ondas plasmônicas, que são excitações eletrônicas acopladas a um campo eletromagnético, geralmente na interface metal-dielétrico. O acoplamento entre o campo eletromagnético e as cargas livres no metal gera uma onda que se propaga na interface metálica e é chamada plasmon polariton de superfície (Surface plasmon polariton – SPP) (Mazulkin, 2016). Estas nanopartículas de metais nobres possuem, então, características plasmônicas e distinguem-se de outras nanoplataformas por apresentarem pontos quânticos semicondutores, nanopartículas magnéticas e poliméricas através das suas

ressonâncias plasmônicas de superfície (SPR) única (Huang e El-Sayed, 2010). A SPR é produto do confinamento de fótons a um pequeno tamanho de partícula, e resulta num aumento das propriedades radioativas e não radioativas das nanopartículas, possibilitando o maior número de utilizações na biologia e medicina (Huang e El-Sayed, 2010).

Dentre as nanopartículas de metais, as mais estudadas são aquelas constituídas de prata e ouro. Estas nanopartículas podem ser obtidas através de diferentes reagentes e reações que geram produtos de diferentes tamanhos e formas. Dentre as formas produzidas, as mais comuns apresentadas até hoje são esferas, fios, hastes e tubos (Raghavendra et al., 2014).

1.1.1 Nanopartículas de ouro

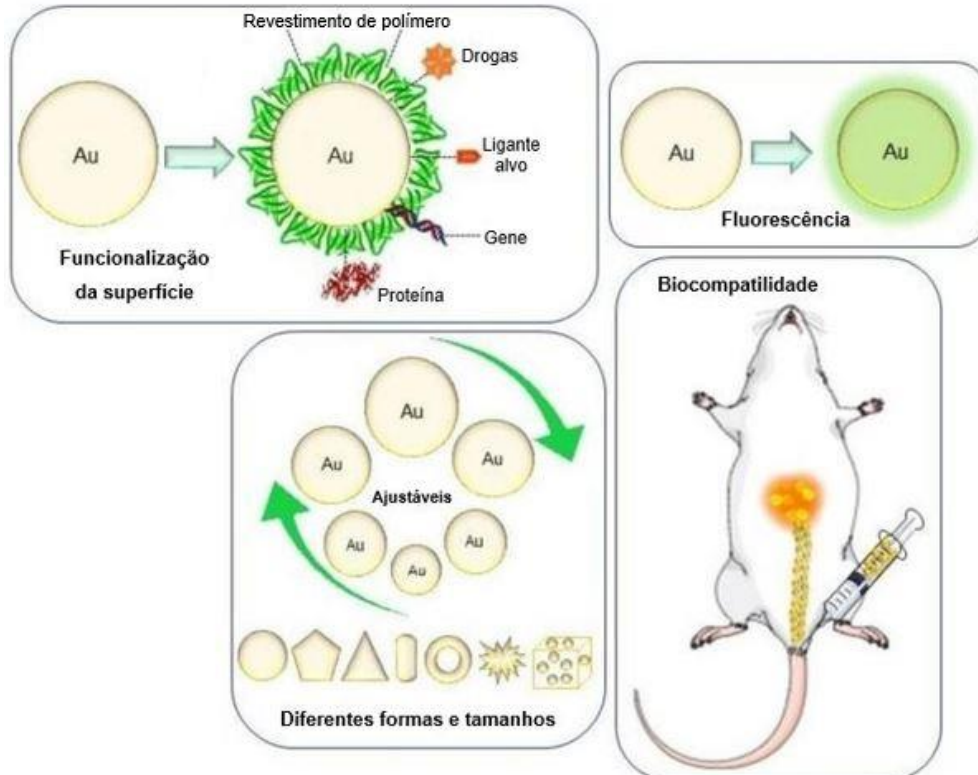
As nanopartículas de ouro, também conhecidas como GNPs (*Gold Nanoparticles*) vêm sendo extensivamente estudadas e utilizadas em diferentes áreas biomédicas, demonstrando um grande potencial de utilização tanto em tratamentos quanto em diagnósticos de doenças (Ghosh et al., 2008; Arunachalan et al., 2014).

As GNPs podem facilmente serem reduzidas a tamanhos que correspondem ao das biomoléculas, como DNA e proteínas, facilitando assim, a sua assimilação a sistemas biológicos (Raghavendra et al., 2014). Além da alta biocompatibilidade, as GNPs podem ser sintetizadas de forma simples e terem sua superfície e propriedades óticas modificadas com facilidade, o que favorece sua utilização para diferentes objetivos terapêuticos (Mody et al., 2010). A figura 1 ilustra algumas das propriedades das GNPs e como ela pode ser utilizada na área biomédica.

Em relação ao desenvolvimento de novos fármacos, monodispersividade e o tamanho das moléculas são fatores importantes a se considerar (Raghavendra et al., 2014). Desta forma, as GNPs se tornam agentes promissores na produção de medicamentos, uma vez que são eficientes carreadores, capazes de proporcionar a entrega de um fármaco ou uma biomolécula ao seu alvo biológico, tanto por estímulos externos quanto e internos (Ghosh et al., 2008). Graças a estas propriedades, as GNPs têm sido muito estudadas como na coadministração de fármacos proteicos, devido à capacidade de atravessar as membranas celulares, possivelmente pelo fato de terem interação com lipídios da superfície celular (Raghavendra et al., 2014;

Shrikhande et al., 2015).

Figura 1 - Propriedades importantes das nanopartículas de ouro.



Fonte: Adaptado de Singh et al., 2018.

Sabe-se ainda, que as GNPs também possuem a capacidade de alterar as vias de sinalização apoptótica, o funcionamento normal e modular no estado redox das células (Gao et al., 2011; Birhanu et al., 2017). Assim, as GNPs são consideradas propícias no carregamento de moléculas para o tratamento tumoral, levando os anti-neoplásicos diretamente para a célula cancerígena, evitando que as células normais sejam atacadas pelo fármaco (Gao et al., 2011; Birhanu et al., 2017), minimizando ou removendo os efeitos secundários em locais não alvos (Bhowmik et al., 2017). Sendo assim, as GNPs são evidenciadas como uma grande promessa, visando trazer avanços significativos no tratamento, diagnóstico e monitoramento do câncer (Wang; Thanou, 2010; Bhowmik et al., 2017; Martinelli et al., 2019).

1.2 CÂNCER

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), o câncer é um

problema de saúde pública e situa-se como a segunda causa de morte em todo o mundo. No ano de 2018, ocorreram mais de 9,6 milhões de mortes, gerando uma estimativa de 1 em cada 6 mortes globais. O câncer ou neoplasia maligna é uma alteração do crescimento e da diferenciação celular com potencial de invasão e disseminação para outras partes do corpo (como tecidos e órgãos). As células cancerígenas possuem a capacidade de se multiplicarem indefinidamente, perdendo sua diferenciação e podendo tornar-se totalmente diferente da célula que a originou (Brasileiro et al., 2016).

As neoplasias malignas surgem por alterações internas (próprias do indivíduo, como alterações genéticas) e alterações externas (adquiridas por fenômenos epigenéticos). Estas alterações podem provocar o surgimento de diferentes tipos de câncer, com variadas características, dentre eles o melanoma e o carcinoma uterino (Brasileiro et al., 2016).

1.2.1 Câncer de pele do tipo melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele originado de células neuroectodérmicas, também conhecidas como melanócitos (células produtoras de melanina - substância responsável pela pigmentação da pele). Sua incidência varia de acordo com a região geográfica, sexo, idade e cor da pele, sendo maior em indivíduos brancos com idade superior a 40 anos (Patterson, 2016). No Brasil, os cânceres de pele são mais frequentes, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados. O câncer de pele tipo melanoma é responsável por apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, entretanto é considerado grave devido à sua alta capacidade de metástase (INCA, 2020).

A exposição a raios UV está intimamente correlacionada com o desenvolvimento de melanomas (Lawrence, 2013). Entretanto, diversos eventos endógenos e exógenos devem ser desencadeados na célula para que ocorra a transformação da mesma em célula tumoral, como por exemplo, a ocorrência de alterações genéticas no DNA das células (Bastian, 2014).

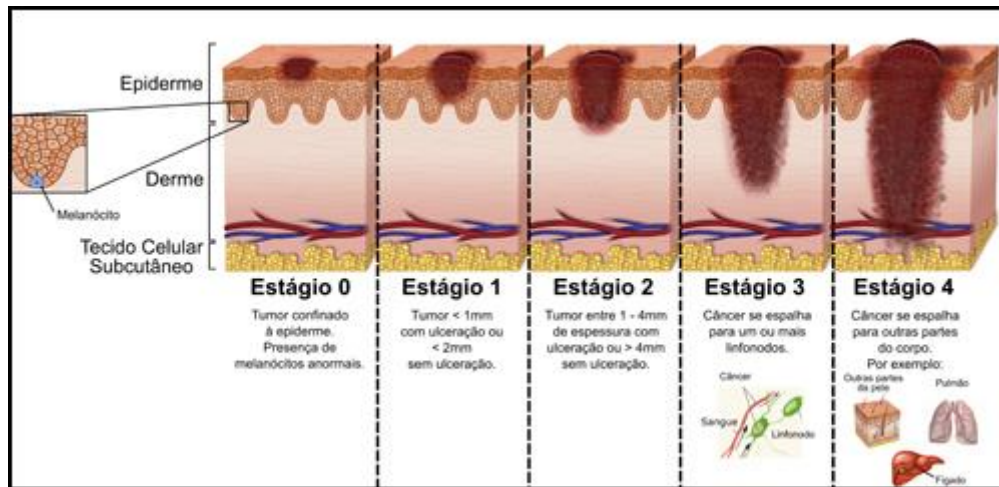
Em um ambiente fisiológico normal, o crescimento de melanócitos é regulado por secreções de queratinócitos (Millet et al., 2017). Devido a mutações em genes-chave que regulam o crescimento celular, os melanócitos são incapazes de responder adequadamente às indicações reguladoras dos queratinócitos, levando a um

crescimento anormal (Millet et al., 2017; Mabeta, 2020). Vários estudos demonstraram que a disseminação do melanoma é o resultado de mutações genéticas e alterações microambientais do tumor, caracterizadas pela superexpressão de proteínas capazes de favorecer a invasão tumoral e a infiltração circundante (Chiriboga et al., 2016; Leonardi et al., 2018).

O melanoma pode ainda ser classificado na população caucasiana por sua origem na pele exposta em excesso ao sol de forma crônica ou intermitente, que se traduz em diferentes locais de origem, grau de exposição cumulativa aos raios UV, idade ao diagnóstico, tipos de fatores oncogênicos e carga mutacional (Candido et al., 2014). De fato os melanomas na pele cronicamente exposta ao sol geralmente aparecem em indivíduos mais velhos (> 55 anos), em áreas mais expostas ao sol, como cabeça e pescoço, bem como na região dorsal das extremidades superiores. Os principais fatores genéticos são o proto-oncogene B-Raf (BRAF), as mutações na neurofibromina 1 (NF1) e NRAS, e geralmente estes melanomas apresentam uma alta carga mutacional relacionada à exposição aos raios UV (Bastian et al., 2014; Candido et al., 2014). Por outro lado, o melanoma associado a casos intermitentes de pele exposta ao sol ocorre em indivíduos mais jovens (<55 anos), em áreas menos expostas ao sol, como o tronco e as extremidades proximais, e geralmente estão associadas ao BRAF^{V600E} e a uma menor carga mutacional (Bastian et al., 2014; Leonardi et al., 2018). Já foi relatado que a mutação no gene BRAF desempenha um papel significativo no desenvolvimento do melanoma levando à ativação constitutiva da via RAS / RAF / MEK / ERK, uma cascata de transdução de sinal que participa da regulação de uma grande variedade de processos, incluindo apoptose, progressão do ciclo celular, diferenciação e proliferação (Roskoski, 2010; Kozovska et al., 2016).

A cirurgia é o tratamento mais indicado, entretanto a radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas conforme o estágio da doença, o local do tumor, o estado geral de saúde do paciente, assim como determinadas características do próprio câncer (INCA 2020). Os estágios da doença são classificados de 0, onde o melanoma não se desenvolveu além da epiderme e é geralmente tratado com cirurgia até o estágio IV quando o mesmo já é metastático (Figura 2) (Pflugfelder et al., 2013; Skin Cancer Foundation, 2020).

Figura 2 - Estágios do melanoma cutâneo.



Inicialmente há grande proliferação celular dos melanócitos devido a alterações genéticas frequentemente oriundas de exposição intermitente à radiação ultravioleta. Esse crescimento celular anormal é acentuado na epiderme (*in situ*), sofrendo aumento de tamanho radial e, por fim, vertical até atingir camadas inferiores da pele. Assim, o câncer encontra a corrente sanguínea, o sistema linfático e tecidos vizinhos, se espalhando por outras partes do corpo.

O diagnóstico clínico precoce é de extrema importância para obter sucesso no tratamento do melanoma (Rigel e Carucci, 2000). A diretriz mais utilizada para auxiliar no diagnóstico é a “ABCD”, onde A significa a assimetria que o melanoma precoce possui devido à seu crescimento desigual; B, as bordas irregulares também causadas pelo desenvolvimento irregular da lesão; C, coloração variada, em tons de preto, marrom claro e marrom escuro, também provocadas pelo mesmo motivo; e D, diâmetro das lesões de aproximadamente 6mm, que devem ser consideradas suspeitas se enquadradas em A, B e C (Friedman et al. 1991).

Diversos medicamentos antineoplásicos vêm sendo testados para atuar como terapia curativa e anti-recidiva do câncer tipo melanoma. Dacarbazina, temozolamida, análogos da platina, vacinas, agentes hormonais, alfa-interferon e Interleucina-2, estão entre os agentes mais testados e utilizados no tratamento. Entretanto, há uma grande dificuldade mundial em se identificar a dose e tempo ideais para o tratamento, uma vez que ao mesmo tempo que se tornam promissores para alguns pacientes, são verdadeiros fracassos para outros. Além disso, a indicação do tratamento deve ser feita de forma individualizada, de acordo com o estadiamento da neoplasia e com o estado de saúde do paciente. Em relação à radioterapia, o melanoma tem sido considerado como um tumor resistente à

radioterapia, com excessão à casos de tumores irresseccáveis (Ministério da Saúde, 2013).

1.2.2 Câncer cervical

O câncer cervical, também conhecido como câncer do colo do útero, é causado principalmente pela infecção persistente do Papilomavírus Humano (HPV). No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo que em 2020 a estimativa é que surjam 16.710 novos casos desse tipo de câncer (INCA, 2020). As principais estratégias de controle do câncer cervical utilizadas em todo mundo são a vacinação contra HPV, a detecção precoce de alterações celulares em mulheres e o tratamento correto e eficaz de todas mulheres diagnosticadas (Vu et al., 2018).

O diagnóstico do câncer cervical é baseado na avaliação histológica da biópsia cervical, sendo que os dois tipos histológicos mais comuns são o carcinoma de células escamosas (mais de 85% dos casos) e o adenocarcinoma. Assim como ocorre em outros tipos de câncer, o estadiamento da neoplasia, ou seja, o quão avançado está o câncer, é utilizado para definir os tratamentos e o prognóstico do paciente (Johnson et al., 2019).

Quando detectado precocemente, as lesões pré-cancerosas que originam o câncer cervical podem ser retiradas de forma simples e baratas através de crioterapia e procedimentos cirúrgicos. Entretanto, uma vez que o diagnóstico é feito já com lesões avançadas, o tratamento de torna mais agressivo e com alto custo (Vu et al., 2018). A remoção cirúrgica é parte da maioria dos tratamentos do câncer cervical e pode ser usada de forma isolada ou em combinação com radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, a depender do estadiamento da lesão. Cisplatina, paclitaxel e carboplatina são os antineoplásicos mais utilizados (Johnson et al., 2019).

Como mencionando anteriormente, os tratamentos mais indicados para a maioria dos tipos de câncer são cirurgia, quimioterapia e radioterapia, que variam na sua utilização conforme o estágio em que o câncer se apresenta (INCA, 2020). No entanto, alguns destes tratamentos podem causar, a curto e longo prazos, uma grande variedade de efeitos adversos (Maurea et al., 2010). Além disso, já existem relatos de falhas terapêuticas e dificuldade das células tumorais em sofrer apoptose, o que leva ao desenvolvimento de tumores resistentes às terapias padrões do câncer

(Badr et al., 2013).

Desta forma, existe uma grande necessidade de se encontrar e produzir novas terapias antineoplásicas, com maior eficácia e segurança. O tratamento ideal seria aquele que afetasse apenas as células tumorais e não tumorais do organismo. Assim, ocorreria uma diminuição dos efeitos adversos do tratamento e melhoria a chance de cura do paciente (Badr et al., 2013; Kulhari et al., 2014)

Os nanomateriais surgem, então, como uma promissora alternativa para ajudar a desenvolver estratégias para melhorar o tratamento dos diversos tipos de câncer, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais dos agentes utilizados (Liu et al. 2013; Raghavendra et al. 2014; Guo et al. 2017; e Farooq al. 2018; Mohammad 2019).

Neste sentido, as GNPs estão sendo utilizadas em diferentes aplicações biomédicas devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (Tomić et al. 2014; Haupenthal et al. 2019). Elas podem ser facilmente funcionalizadas (-NH₂ e -SH), o que permite uma variedade de abordagens para o design de novos sistemas de administração de medicamentos (Nghiem et al. 2010; Mandal et al. 2009; Sindhu et al. 2014; Elbially et al. 2015 ; Devi et al. 2016; Woźniak et al. 2017; Farooq et al. 2018; Pourshohod et al. 2019), Além disso, as GNPs podem ter seu tamanho reduzido , inferior a 50 nm, o que facilita sua interação com células e tecidos em seres humanos (Liu et al. 2013; Raghavendra et al. 2014; Kumar et al. 2017). No entanto, é importante ressaltar que para aplicações biomédicas, elas precisam ser controladas com precisão em termos de morfologia e tamanho, além de sua estabilidade e biocompatibilidade (Ojea-Jimenez et al. 2010; Elbially et al. 2015).

Conforme já mencionado, as GNPs podem ser obtidas com facilidade por vários métodos químicos e físicos (Wang et al. 2007), sendo que um dos métodos mais tradicionais para sua preparação é baseado em uma reação de redução com citrato, denominado método Turkevich (Liu et al., 2007; Park e Shumaker-Parry 2014). O método Turkevich é o meio mais comum para a síntese de GNPs devido à sua simplicidade e facilidade de obter GNPs de tamanhos diferentes (Liu et al., 2007; Huang e El-Sayed 2010; Guo et al. 2017).

As propriedades físico-químicas das GNPs têm uma relação importante com a interação desses nanomateriais com o ambiente biológico (Mailänder, Landfester 2009; Ojea-Jimenez et al. 2010; Verma e Stellacci 2010; Liu et al. 2013; Blanco et al. 2015). Além disso, a citotoxicidade das GNPs varia de acordo com o tipo de

células utilizadas, sendo algumas linhagens mais resistentes e outras mais sensíveis ao tratamento com GNPs. Sendo assim, estudos *in vitro* atuam de forma eficaz como um método de pré-seleção para avaliar os efeitos biológicos desses nanomateriais. O efeito citotóxico das GNPs pode ser explicado por diferentes propriedades metálicas, apresentando variados mecanismos celulares de morte (Liu et al. 2013; Chugh et al. 2018).

De acordo com Chugh et al. (2018), as GNPs são anti-angiogênicas uma vez que inibem a sinalização da normal da célula após a ligação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ao seu receptor na célula. Tiloke et al. (2016) mostraram que as GNPs induziram a expressão da caspase-9 nas células A549, o que inicia a via de sinalização das caspases envolvida na indução de apoptose. No entanto, tem sido muito difícil avaliar a biodistribuição, depuração e toxicidade das GNPs, devido aos diferentes modelos experimentais utilizados, onde ocorrem variações das propriedades físico-químicas, modelos animais e/ou tipo de célula, concentração de entrega e rotas de administração (Guo et al. 2017).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar GNPs com diferentes tamanhos e avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* nas seguintes linhagens celulares: eritrócitos humanos, fibroblastos murinos (NIH 3T3), melanoma (B16F10) e carcinoma do colo do útero humano Células (HeLa).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocompatibilidade de nanopartículas de ouro (GNPs) com diferentes tamanhos e concentrações em células cancerígenas de melanoma B16F10, células de carcinoma de colo uterino humano (HeLa) e células não cancerígenas de fibroblastos murino (NIH 3T3) e eritrócitos humanos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Caracterizar a estrutura da GNPs de tamanho de 10, 20 e 30 nm.
- II- Identificar em qual tamanho as GNPs apresentam maior citotoxicidade celular.
- III- Verificar em qual concentração das GNPs apresentam maior citotoxicidade celular.
- IV- Avaliar a capacidade citotóxica das GNPs em cultivo *in vitro* de células de melanoma B16F10, células de carcinoma de colo uterino humano (HeLa), fibroblastos murino (NIH 3T3) e eritrócitos humanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos e testes apresentados neste trabalho foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (FISIOPAT) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

3.1 MATERIAIS

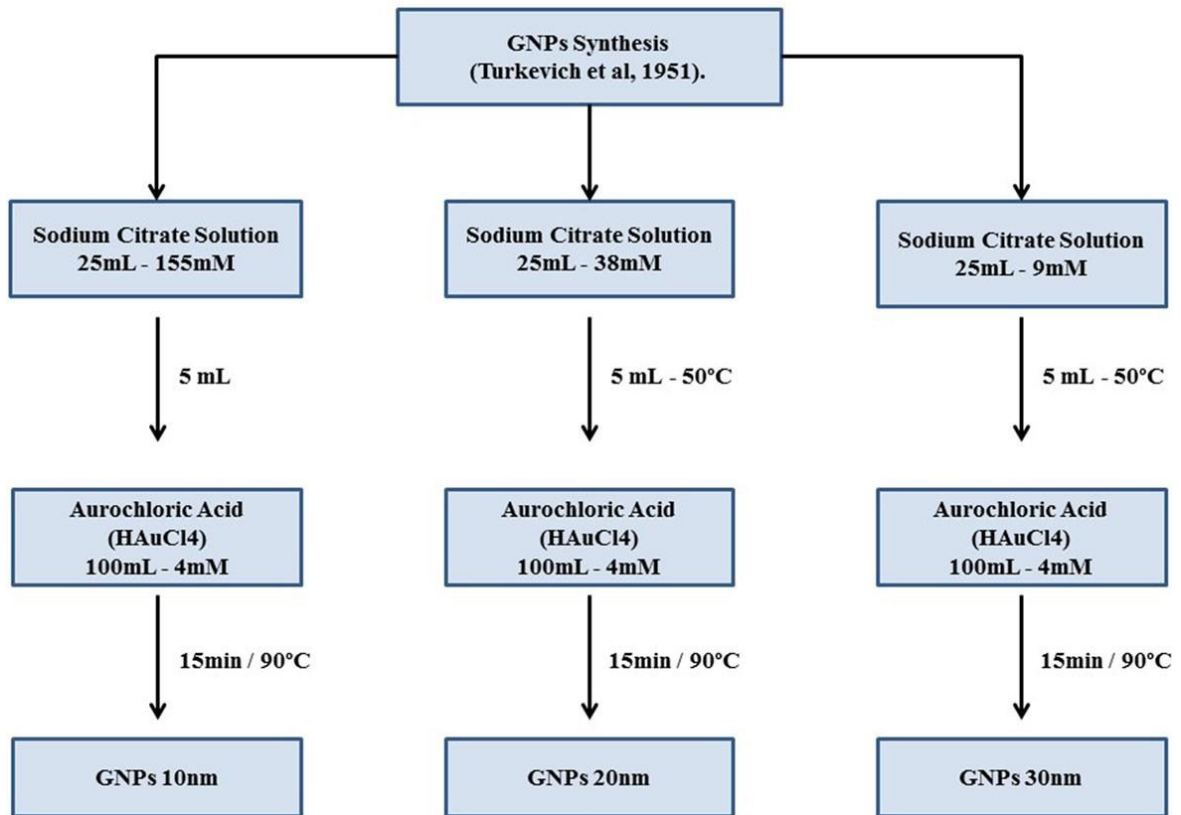
Ácido auroclorídrico (HAuCl_4), meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB), tripsina-EDTA 0,25% e penicilina-estreptomicina foram adquiridos em Sigma-Audrich, Brasil; citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) foi adquirido da Synth-Brasil. O reagente de viabilidade celular AlamarBlue® foi adquirido da Thermo Fisher Scientific. As linhagens celulares B16F10 foram adquiridas a partir da cultura celular americana denominada ATCC (American Type Culture Collection). As Linhagens celulares NIH3T3 e HeLa foram obtidas no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo).

3.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As GNPs foram sintetizadas de acordo com o método descrito por Turkevich et al. (1951), com pequenas modificações. A síntese ocorreu através da reação química de redução do ácido tetracloaúrico (HAuCl_4) pelo citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) em meio aquoso. Primeiramente, uma solução de 100 mL de HAuCl_4 na concentração de 4 mM foi aquecida a 90 °C sob agitação vigorosa. O tamanho dos GNPs foi controlado variando a concentração do agente redutor. Para a produção de GNPs de 10 nm, a solução de citrato de sódio foi diluída em 25 mL de água ultra pura na concentração de 155 mM. Para as GNPs de 20 nm, a concentração do citrato de sódio utilizada foi de 38 mM em 25 mL de água. A reação para gerar as GNPs de 30 nm, foi realizada com 100 mL de solução de citrato de sódio em água na concentração de 9 mM. Para GNPs de 20 e 30 nm, a solução de citrato foi aquecida a uma temperatura de 50 °C antes de ser adicionada. Ao atingir a temperatura desejada, 5 mL da solução de citrato de sódio (155, 38 e 9 mM) foram adicionados gota a gota ao HAuCl_4 para se iniciar a reação. Após aproximadamente 15 minutos, foi possível observar as colorações específicas para cada tamanho de GNPs. Um fluxograma

mostrando todas as etapas da síntese de GNPs com diferentes tamanhos é mostrado na figura 3.

Figura 3 - Fluxograma ilustrando todas as etapas da síntese de GNPs de diferentes tamanhos.



Fonte: Dos autores, 2020.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise da morfologia e estimativa do tamanho médio das GNPs utilizou-se a técnica Microscopia Eletrônica Transmissão (MET) da marca JEOL, modelo JEM 2100F de 100kV, que se encontra alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Na preparação das amostras, uma gota da solução GNPs foi adicionada em um grid contendo carbono (grid de cobre – 200 mesh). Após o tempo de secagem dos grids (24hrs), as imagens foram obtidas.

3.3.2 Diâmetro Médio das Nanopartículas

O diâmetro médio (em intensidade) das GNPs, foram determinados através da técnica de Espectroscopia de Correlação de Fótons ou Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633 nm), da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle de Processos e de Polimerização (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas a 20°C a partir de uma alíquota das soluções das GNPs sem prévia diluição.

3.3.3 Potencial Zeta

O potencial zeta, que reflete o potencial elétrico de superfície das partículas e fornece informações acerca da estabilidade da formulação, foi determinado através da técnica de Anemometria de Laser Doppler associada à microeletroforese utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS, da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle de Processos e de Polimerização (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas a 20°C a partir de uma alíquota das GNPs sem prévia diluição.

3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em espectrômetro Agilent Technologies (Cary 600 Series). Para obtenção dos espectros, amostras de GNPs secas a 30°C foram incorporadas em KBr, seguido da compressão para formação de pastilhas. As análises foram conduzidas com varreduras na faixa de 4000 - 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

3.3.5 Difração de Raio – X

A difração de raios-X (DRX) é uma ferramenta útil para a medida do grau de cristalinidade de polímeros e outros materiais. A informação primária geralmente obtida das análises é a estrutura de polímeros semicristalinos. A cristalinidade do GNPs pode ser obtida através da medida de intensidade relativa dos picos de difração nas partes cristalina e amorfa. A fase cristalina das GNPs foi identificada por medidas

de difração de Raios-X utilizando uma radiação cobre $K\alpha$ (1,54056 Å) a 45 kV/40 mA com uma velocidade de varredura angular de 2θ e com um tempo de passo de 1 segundo.

3.4 ESTUDOS *IN VITRO*

3.4.1 Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Feuser et al. (2015). Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brasil (número 12984919.7.0000.0119). Os glóbulos vermelhos humanos (eritrócitos) foram obtidos de três doadores saudáveis. O sangue dos doadores foi coletado em tubos contendo 3,2% em peso de citrato de sódio. Quatro mililitros de sangue total foram adicionados a 8 mL de solução salina estéril e os eritrócitos foram isolados do soro por centrifugação a $1.500\times g$ por 10 min sendo lavados com solução salina por três vezes. Após a lavagem final, os eritrócitos foram diluídos em 2 mL de solução salina em um eppendorf. Em seguida, 40 μL da diluição foram adicionados a 960 μL de soro fisiológico em um novo tubo. Os eritrócitos foram incubados com GNPs de 10, 20 e 30 nm em diferentes concentrações: 5, 10, 15, 20, 28 e 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37 °C sob agitação (100 rpm) por 120 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a $10.000\times g$ por 5 min, e 100 μL de sobrenadante foram transferidos para uma placa de microtitulação de 96 poços, e a absorbância foi medida a 540 nm (SpectraMax M3). Como controles positivo e negativo, incubaram-se 30 μL da suspensão do eritrócito com 970 μL de água destilada e solução salina, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.2 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade das GNPs foi avaliada em uma linhagem de célula não tumoral (NIH 3T3) e duas linhagens de células tumorais (B16F10 e HeLa). Todas as células foram cultivadas em um meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em incubadora umidificada contendo 5% de CO_2 .

Para os ensaios de citotoxicidade (Mossmann, 1993), as células foram plaqueadas na quantidade de 1×10^4 células/poço em placa de 96 poços e incubadas por 24h (37 °C – CO₂ 5%). Após o período de incubação, as células foram tratadas com DMEM contendo diferentes concentrações de GNPs de 10, 20 e 30 nm e incubadas por mais 24h. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio AlamarBlue® (Invitrogen 2007). AlamarBlue® é um indicador fluorescente/colorimétrico, onde sua forma oxidada entra no citosol e é convertida por enzimas mitocondriais. A forma oxidada do corante tem uma cor azul, indicando não fluorescência, portanto, células não viáveis. A cor rosa é a forma reduzida do corante, indicando a presença de células viáveis (Invitrogen 2007). Depois de 24h de incubação, o DMEM foi retirado e 10% de AlamarBlue® diluído em DMEM incompleto foi adicionado em cada poço. As células foram incubadas durante 3h (37 °C, 5% CO₂). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a absorbância foi medida em um leitor de microplaca (Loccus LMR-96) com comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. A viabilidade celular foi calculada com a seguinte equação (1):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{M_s \times \frac{C_n(570\text{nm})}{C_n(600\text{nm})}}{C_p(600\text{nm}) \times \frac{C_n(570\text{nm})}{C_n(600\text{nm})}} \quad (1)$$

onde M_s é a média da amostra e C_n e C_p são o controle negativo (meio de cultura sem células) e positivo (apenas células), respectivamente.

3.4.3 Análise estatística

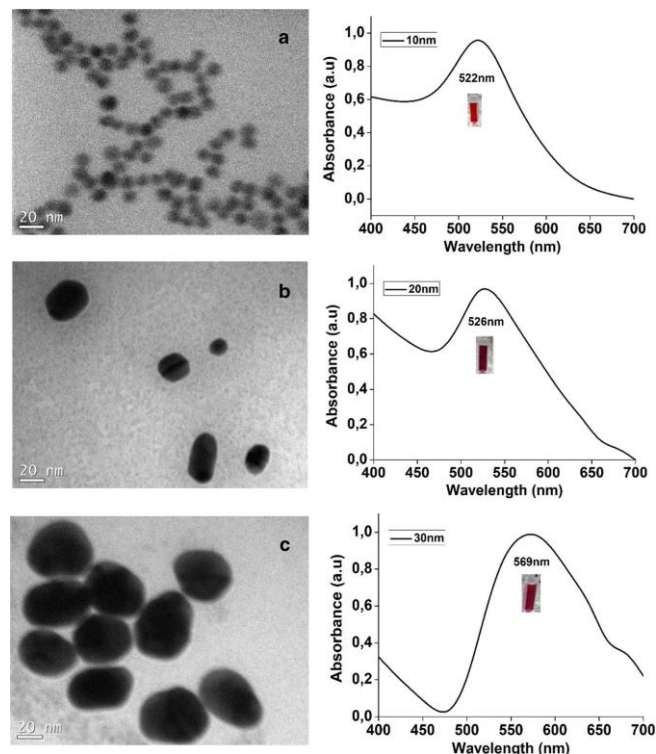
Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação com o grupo controle (células não tratadas). A análise de variância ANOVA de duas vias foi utilizada para todas as análises com um nível de significância estabelecido em $p < 0,05$, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey usando o software GraphPad Prism versão 7.0. A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das células HeLa e B16F10 foi calculada por ajuste de curva não linear usando o software GraphPad Prism versão 8.0.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPs

As GNPs de 10 nm, 20 nm e 30 nm apresentaram diferentes picos de absorção máximo na região do visível, bem como diferentes colorações, conforme demonstrado na Figura 4 e Tabela 1. Como pode ser observado a partir das análises de UV-Vis (Figura 4), o pico de absorção máximo cresceu com aumento do tamanho das nanopartículas. Esses resultados foram validados por imagens de MET, que confirmaram o tamanho médio das GNPs apresentado por UV-vis (Figura 4). A partir das imagens TEM, uma morfologia esférica pode ser observada para as GNPs de 10 nm. As GNPs de 20 e 30 nm apresentaram morfologia oblonga (quase esférica) (Grzelczak et al. 2008; Liu et al. 2013; Abdulkin et al. 2014). Análises de DLS e potencial zeta são apresentados na Tabela 1. As análises de DLS foram similares ao tamanho apresentado nas imagens de MET. As GNPs apresentaram uma carga de superfície negativa.

Figura 4 - Imagens MET e espectros de UV-Visde de soluções de GNP com diferentes tamanhos de partícula.



a – GNPs de 10 nm. b - GNPs de 20 nm. c – GNPs de 30 nm.

Fonte: Dos autores, 2020.

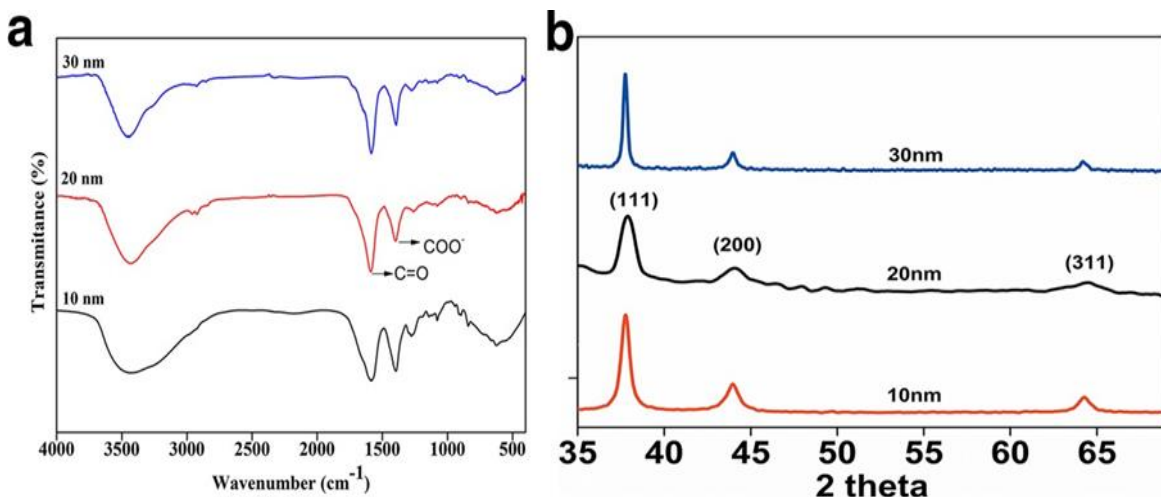
Tabela 1 - Propriedades dos diferentes GNPs obtidos pelo método de Turkevich: cor, absorção máxima (UV-Vis), potencial zeta (Zetasizer) e tamanhos hidrodinâmicos (DLS).

GNPs (nm)	COR	Absorção máxima (UV-Vis)	Potencial zeta (mV)	Tamanho hidrodinâmico (nm)
10	Vermelho	522	- 58 ±4	11 ±3
20	Roxo	524	- 42 ±4	26 ±4
30	Roxo-caramelo	569	- 34 ±3	34 ±4

Fonte: Dos autores, 2020.

A análise da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para observar a ligação dos íons citrato com as GNPs (Figure 5a), mostrando as bandas de absorção características das ligações C=O e COO⁻. A estrutura cristalina foi observada a partir das análises do difratograma por DRX, onde apresentou um ângulo 2θ característico como mostrado na Figura 5b.

Figura 5 - FTIR (a) e XRD (b) espectros de GNPs de 10, 20, and 30 nm.



Fonte: Dos autores, 2020.

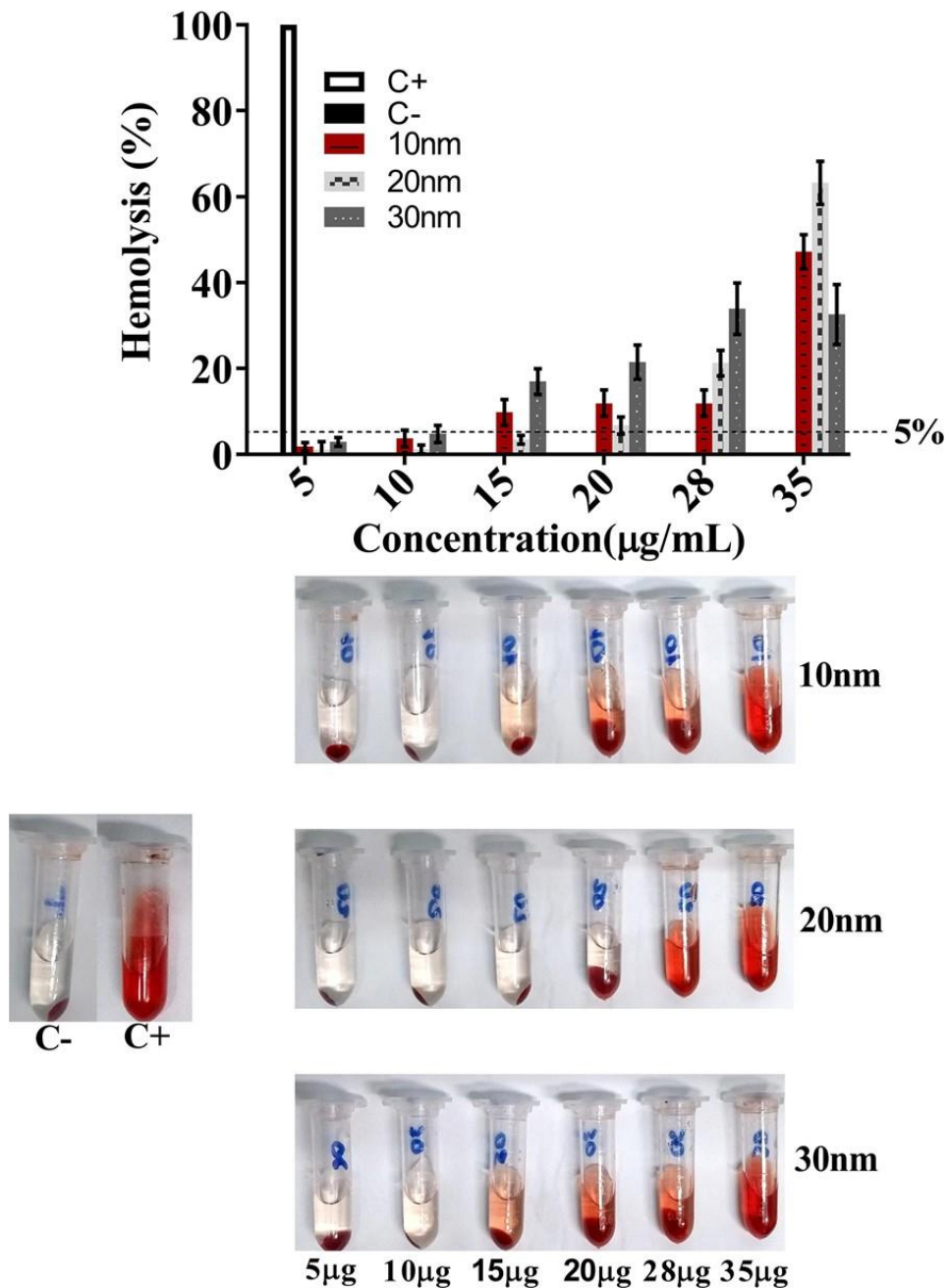
4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

4.2.1 Ensaio de hemólise

Os ensaios de hemólise foram realizados para avaliar a hemocompatibilidade das diferentes GNPs, como mostrado na Figura 6. As GNPs de tamanho 10, 20 e 30nm nas concentrações de 5 e 10 µg/mL e as GNPs de tamanho 20nm nas

concentrações de 15 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não apresentaram atividade hemolítica. Entretanto, na concentração de 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as GNPs de tamanho 20 nm foi a que apresentou maior atividade hemolítica e as GNPs de tamanho 30 nm as que apresentaram menor atividade. Por outro, lado nas concentrações de 15, 20 e 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as GNPs de tamanho 30 nm foram as que tiveram maior atividade hemolítica.

Figura 6 - Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos incubados com GNPs de 10, 20 e 30 nm em soluções com diferentes concentrações. Dados representados com \pm SD (n = 3).

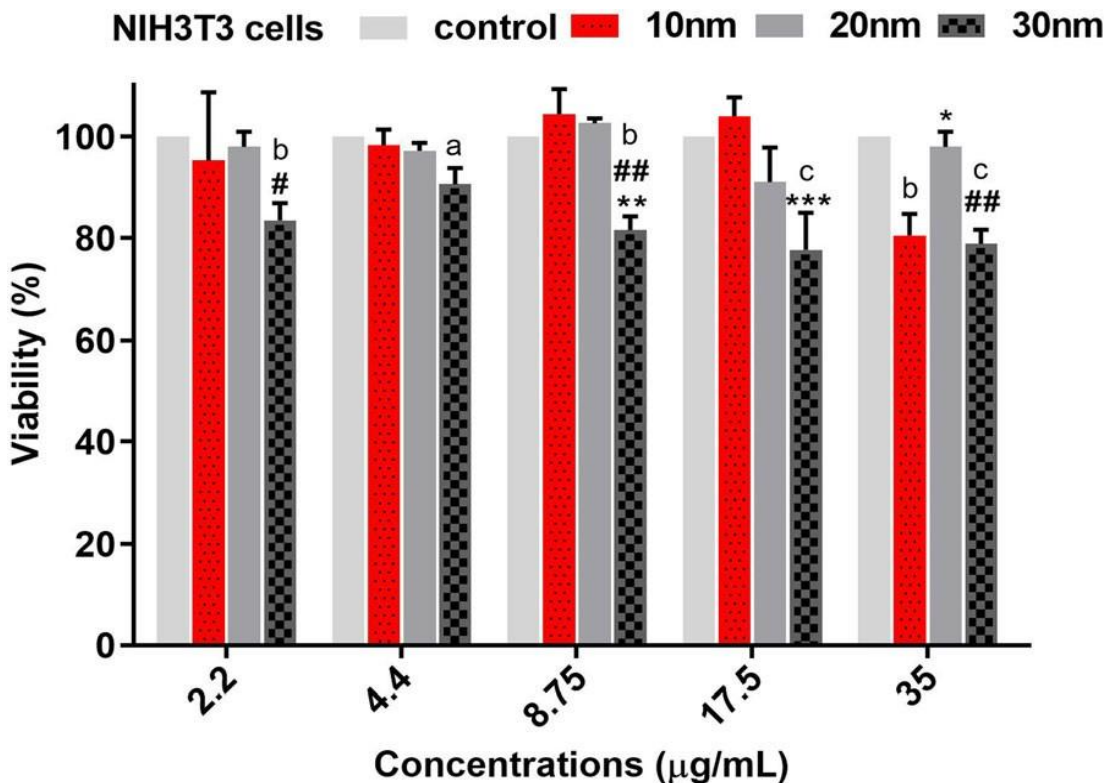


Fonte: Dos autores, 2020.

4.2.2 Ensaios de citotoxicidade em células não cancerígenas NIH 3T3

A biocompatibilidade de GNPs foi avaliada em células de fibroblastos murinos não cancerígenas (NIH3T3). Como pode ser observado na Figura 7, as GNPs de 30 nm mostraram maior efeito citotóxico para as células NIH 3T3 quando comparado com as GNPs de 10 nm e 20 nm GNPs ($p < 0,001$; $p < 0,0001$) em todas as concentrações. As GNPs de 20 nm não apresentaram qualquer efeito citotóxico sob as células NIH 3T3 ($p < 0,05$). As GNPs de 10 nm foram citotóxicas apenas nas concentrações mais altas de 35 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

Figura 7 - Citotoxicidade *in vitro* de soluções de GNPs de 10, 20 e 30 nm nas células NIH 3T3.



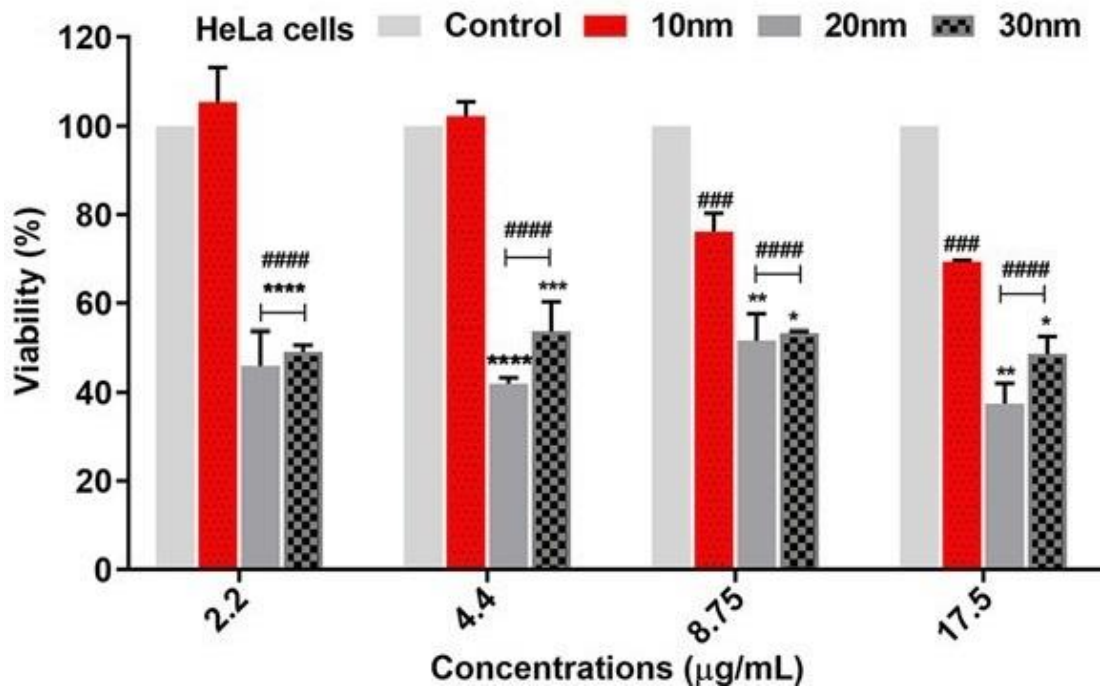
Diferenças significativas são mostradas ($p < 0,01$, $bp < 0,001$, $cp < 0,0001$ quando comparado com o grupo controle; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ quando comparado com GNPs de 10 nm, e # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$ quando comparado com GNPs de 20 nm; ANOVA de dois fatores seguida pelo teste de Tukey).
Fonte: Dos autores, 2020.

4.2.3 Ensaios de citotoxicidade em células cancerígenas HeLa

A citotoxicidade das GNPs (10 nm, 20 nm e 30 nm) também foi avaliada em células de HeLa de câncer cervical. Como pode ser observado na Figura 8, as GNPs

de tamanho de 10 nm tiveram um menor efeito citotóxico sob as células HeLa quando comparado com as GNPs de 20 nm e 30 nm em todas as concentrações testadas. Além disso, as GNPs de 10 nm não apresentaram diferença significativa com o grupo controle nas concentrações de 2,2 e 4,4 µg/mL. Por outro lado, nas concentrações de 2,2 e 17,5 µg/mL as GNP de 20 foram as mais citotóxicas.

Figura 8 - Citotoxicidade *in vitro* de soluções de GNPs de 10, 20 e 30 nm nas células HeLa.



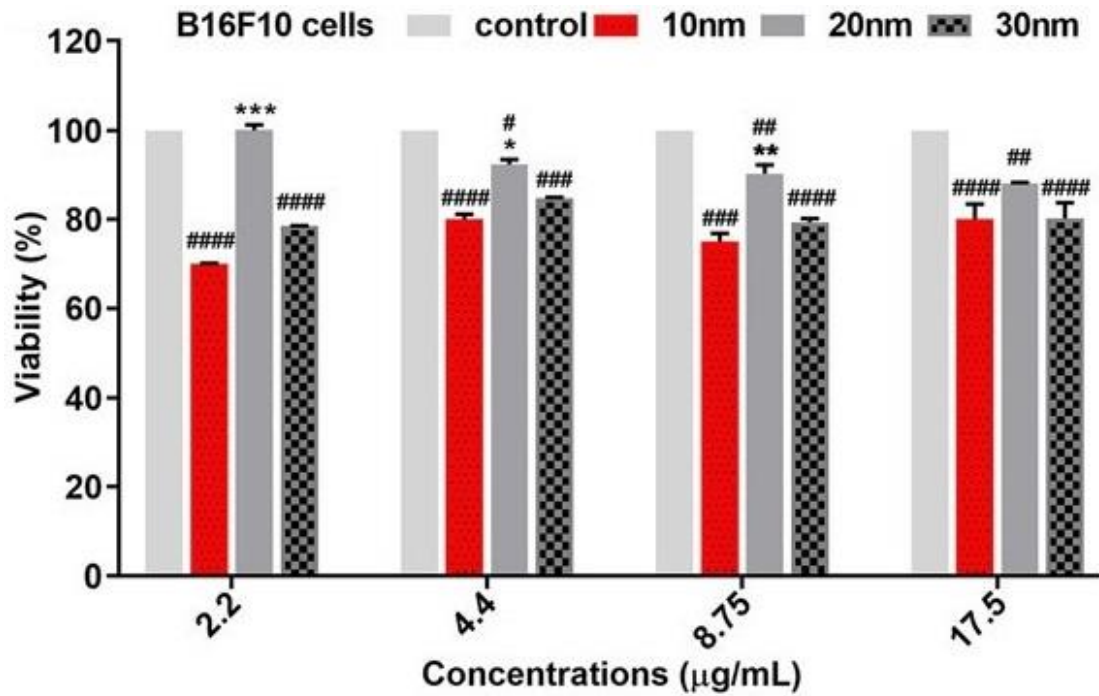
Diferenças significativas são mostradas (### p <0,0001, #### p <0,0001) quando comparado com o grupo controle; * p <0,01, ** p <0,001, *** p <0,0001 quando comparado com GNPs de 10 nm; ANOVA de dois fatores seguida pelo teste de Tukey).

Fonte: Dos autores, 2020.

4.2.4 Ensaios de citotoxicidade em células cancerígenas B16F10

A citotoxicidade das GNPs (10 nm, 20 nm e 30 nm) também foi avaliada em células de B16F10 de câncer do tipo melanoma, a Figura 9 contém estes resultados. As GNPs de tamanho de 20 nm foram as que tiveram um menor efeito citotóxico sobre as células B16F10 em todas as concentrações testadas quando comparado com as GNPs de 10 nm e 30 nm. Além disso, as GNPs de tamanho 20 nm não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o grupo controle na concentração de 2,2 µg/mL. As GNPs de tamanho 10 e 30 nm tiveram atividades citotóxicas muito parecidas em todas as concentrações avaliadas.

Figura 9 - Citotoxicidade *in vitro* de soluções de GNPs de 10, 20 e 30 nm nas células B16F10.



Diferenças significativas são mostradas (#p <0,01, ## p <0,001, ### p <0,0001, #### p <0,0001 quando comparado com o grupo controle; * p <0,01, ** p <0,001, *** p <0,0001 quando comparado com GNPs de 10 nm; ANOVA de dois fatores seguida pelo teste de Tukey).

Fonte: Dos autores, 2020.

5. DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), o melanoma é o câncer de pele mais agressivo e letal, tendo um aumento considerável nos últimos 40 anos. (Khazaei et al. 2019). Já o câncer de colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres responsável por milhares óbitos todos os anos, sendo a quarta causa mais frequente de morte por câncer em mulheres. Com tudo é de fundamental importância a busca de novas alternativas para tratamento Câncer (Liu et al. 2018). Como relatado na introdução deste trabalho o uso da nanotecnologia vem surgindo como ótima opção para o tratamento de diferentes tipos de câncer. Entretanto, ainda que a nanotecnologia tenha avançado em tratamentos terapêuticos e em diagnósticos, o seu potencial efeito na saúde humana ainda não foi determinado, devido à escassez e controversas de informações sobre os efeitos da toxicidade desses nanomaterias (Cancino et al., 2014).

Em relação às GNPs, tem-se uma preocupação de como essas nanopartículas penetram nas membranas celulares, quando comparado a outros fármacos e moléculas (Cancino et al., 2013). Análises *in vitro* ainda que muito utilizadas, resultam em informações pouco precisas e muito contraditórias (Villiers et al., 2010; Cancino et al., 2014). De uma forma geral a literatura vem postulando que quanto maior o tamanho da GNP e maior a sua concentração, maior será sua toxicidade. Porém, uma análise mais detalhada na variação dos resultados da toxicidade de GNPs testadas *in vitro* demonstram que diversos outros fatores associados, tais como tamanho, forma, revestimento, concentração, dentre outros, devem ser levados em consideração e podem influenciar na toxicidade em que as GNPs podem apresentar (Villiers et al., 2010), dificultando na obtenção de resultados precisos.

Como base nestes dados, o objetivo deste trabalho foi sintetizar, caracterizar GNPs com diferentes tamanhos e avaliar seu efeito citotóxico em diferentes linhagens celulares de câncer, em fibroblasto e em eritrócitos humanos. Nossa hipótese é que além dos fatores citados, o tipo de célula também deve ser levado em consideração. Assim diferentes GNPs (10 nm, 20 nm e 30nm) foram sintetizadas pelo método de Turkevich.

O controle do tamanho das GNPs foi obtido pelo ajuste da concentração de citrato, como mostrado na figura 5. O uso do citrato serve como redutor parando a

reação de formação das nanopartículas, então as diferentes concentrações de citrato age parando a formação das nanopartículas em momentos diferentes, formando assim GNPs de diferentes tamanho (Ojea-Jimenez et al. 2010; Guo et al. 2017).

Como observado nas análises de UV-Vis, as GNPs apresentaram picos de absorção máximo característico do tamanho de cada GNPs sintetizada. A cor de cada GNPs foi dependente do tamanho e da densidade dos estados eletrônicos (Eustis e El-Sayed 2006; Liu et al. 2007; Toma e Bonifácio 2015). Como pode ser visto na Figura 3 as GNPs de 10 nm mostraram uma coloração vermelha devido às transições entre as bandas que acomodam a superfície de elétrons (Toma e Bonifácio 2015). Esta coloração é característica das GNPs com tamanho na faixa de 2 à 10nm (Toma e Bonifácio 2015). As GNPs de 20 e 30 nm apresentaram coloração roxa e roxa-caramelo, respectivamente. A coloração das maiores GNPs muda devido ao aumento da densidade dos estados eletrônicos e a consequente diminuição da energia de transição entre as bandas, atingindo assim uma cor próxima ao violeta (Toma e Bonifácio 2015). De uma forma geral, o máximo de absorção no espectro UV-Vis das soluções coloidais está relacionado ao tamanho, distribuição e concentração média das partículas. A largura da banda de absorção está relacionada à dispersão das partículas. Pode-se notar pela figura 4 e tabela 1 que o máximo de absorção amostrado foi de 522, 526 e 569 nm, o que caracteriza GNPs com tamanho aproximado de 10 (He et al., 2005), 20 e 30 (Shilo et al., 2015), respectivamente.

Os resultados demonstraram que a concentração do agente redutor tem também influência direta no tamanho e na morfologia dos nanomateriais (Zhang et al. 2010). Como observado a partir das imagens de MET da figura 4, o aumento do tamanho das GNPs alterou a morfologia do material. GNPs de 30nm apresentaram uma morfologia menos esférica, quando comparado com as GNPs de 10nm e 20nm. Análises de DLS mostrado na tabela 1 validou os dados apresentados pelo MET. O maior tamanho das GNPs apresentado pelas análises de DLS está relacionado à presença do citrato nas superfícies das GNPs (Li et al. 2018).

Um fato interessante é que as GNPs esféricas não são consideradas citotóxicas. Por exemplo, quando usadas em linhagem celular de leucemia humana (K562) e quando apresentadas em tamanhos de 4, 12 e 18 nm e incubadas por 3 dias, com concentração até 150 μ M não apresentaram nenhuma toxicidade (Connor et al., 2005). Desta forma, baseado somente na literatura era esperado que as GNPs de 30 nm por serem as menos esféricas fossem as mais citotóxicas em todas as células

utilizadas, fato que não foi comprovado no nosso estudo reforçando assim nossa hipótese.

Outro importante parâmetro para ser avaliado quando se deseja aplicar um novo material na área médica é a análise de superfície de carga/potencial zeta. Como observado na Tabela 1, todas as GNPs sintetizadas apresentaram uma superfície de carga negativa. A carga negativa das GNPs está relacionada com a utilização do citrato que deixou um grupo carboxila nas superfícies da GNPs, confirmado pela análise de FTIR mostrada na figura 5. Conforme observado na Tabela 1, a carga das GNPs foi mais negativa para as GNPs de 10 nm devido à maior concentração de carboxila na superfície, seguida pelas GNPs de 20 nm e 30 nm. A alta carga negativa apresentada pelas GNPs, garante uma excelente estabilidade coloidal (Ghosh et al. 2008; Wang et al. 2016; Mohammad 2019). Em adição, a estabilidade das GNPs foi confirmada por análises de UV-Vis e potencial zeta. Após 30 dias, não foram observadas quaisquer alterações nas propriedades físico-químicas das soluções de GNPs, ou seja, não houve qualquer alteração no pico de absorção máximo e nas superfícies de carga das diferentes GNPs sintetizadas.

A partir das análises de FTIR pode se verificar a formação das GNPs. A Figura 4a mostra as bandas características das diferentes GNPs em 1395 e 1586 cm^{-1} , na qual correspondem ao alongamento simétrico e assimétrico de COO^- (Nghiem et al. 2010; Mohan et al. 2013; Park e Shumaker-Parry 2014; dos Santos Haupenthal et al. 2020). Esses resultados confirmam a interação entre o grupo carboxila proveniente do citrato com as GNPs. Os espectros de DRX na figura 5B mostraram claramente a cristalinidade das diferentes GNPs com aparecimento de picos característicos (2θ) em $37,7$ (111), pico em $44,4$ (200), pico em $63,8$ (311) (Cardoso et al. 2014; Baskar et al. 2018). As análises de FTIR e DRX então confirmaram a formação e pureza das GNPs.

Desta forma, após a caracterização da morfologia, tamanho e pureza dos três tamanho de GNPs sintetizados, bem como o conhecimento das suas propriedades físico-química, as GNPs de 10nm, 20 nm e 30 nm foram expostas em diferentes linhagens celulares para avaliação dos seus efeitos citotóxicos.

Primeiramente avaliou a biocompatibilidade das nanopartículas em Eritrócitos humanos saudáveis. Os eritrócitos foram tratados com GNPs de 10 nm, 20 nm e 30 nm usando diferentes concentrações, conforme mostrado na figura 6. De acordo com o critério do Método de Teste Padrão para Análise de Propriedades Hemolíticas de Nanopartículas (E2524-08), a porcentagem de hemólise $> 5\%$ indica que o material

testado não apresenta hemocompatibilidade, ou seja, é considerado um material hemolítico.

O ensaio de hemólise mostrou que todas as GNPs causaram danos hemolítico quando expostos aos eritrócitos humanos nas concentrações de 28 e 35 $\mu\text{g/mL}$. Nas concentrações de 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, as GNPs de 10 nm e 30 nm apresentaram taxa de hemólise $> 5\%$, indicando que estas GNPs apresentaram danos aos eritrócitos. Em contraste, as GNPs de 20 nm não causaram qualquer dano aos eritrócitos humanos nestas mesmas concentrações (15 e 20 $\mu\text{g/mL}$), apresentando uma taxa de hemólise $< 5\%$. Nenhuma das GNPs testadas causou danos aos eritrócitos humanos nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados sugerem que as GNPs de tamanho de 20 nm apresentam uma maior hemocompatibilidade quando comparado com as GNPs de 10 e 30 nm, mas reforçando nossa hipótese a concentração usada tem que ser levada em consideração. Em concentrações mais elevada, as GNPs de tamanho de 20 nm passaram a ser considerada como as que tinham propriedade de maior hemocompatibilidade para que apresentem menor hemocompatibilidade quando comparada as GNPs de 10 e 30 nm.

Assim, nossos resultados mostraram que a atividade hemolítica foi dependente da concentração e do tamanho/morfologia das GNPs. Resultados semelhantes foram apresentados por He et al. 2018 que também viu uma boa hemocompatibilidade nas GNPs de tamanho de 20 nm em baixas concentrações. Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que o uso de altas concentrações de GNPs pode ocasionar em um acúmulo nos tecidos desencadeando assim um efeito tóxico aos eritrócitos (Lasagna-Reeves et al. 2010; Ferreira et al. 2015; Lopez-Chaves et al. 2018).

Esses resultados foram validados com os ensaios de citotoxicidade em células não cancerígenas de fibroblasto (NIH 3T3). Neste estudo as GNPs de tamanho de 20 nm não apresentaram qualquer efeito citotóxico sob as células NIH 3T3. Em contrapartida, as GNPs de tamanho de 30 nm foram as mais citotóxicas para os fibroblastos. Estes resultados foram similares ao mostrados nos ensaios de hemólise, onde as GNPs de tamanho de 30nm também foram as que desencadearam um maior dano aos eritrócitos humanos. Como comentado anteriormente, a maior citotoxicidade pode estar relacionada com o acúmulo das nanopartículas nas células (Xiao-Dong Zhang et al, 2011). Kim et al. 2012, observaram que diferentes estados do ciclo celular podem afetar a taxa de internalização da GNPs. De acordo com Coradeghini et al.

(2013), o tamanho e a quantidade de GNPs internalizados são fatores críticos para a determinação da citotoxicidade das GNPs. Com isso, pode-se supor que as GNPs de tamanho de 30nm apresentou uma maior afinidade as células de fibroblasto e aos eritrócitos humanos, ocasionando assim um maior efeito tóxico sob as células não tumorais.

Reforçando mais uma vez nossa hipótese que a linhagem celular deve ser levada em consideração junto com a concentração e outros fatores já citados, os testes de compatibilidades em duas células não cancerígenas mostraram que as GNPs de tamanho 30 nm comportaram de forma diferente dependendo da linhagem celular em que foram expostas. Enquanto para os fibroblastos as GNPs de tamanho 30 nm na maior concentração (35 µg/mL) foram as que tiveram maior citotoxicidade, nos eritrócitos, na mesma concentração, este foi o tamanho que apresentou menor hemotoxicidade quando comparado com as GNPs de tamanho 10 e 20 nm. De toda forma, dentro do limite do nosso experimento, de termos testado em apenas dois tipos de célula não cancerígenas, podemos supor que as nanopartículas de tamanho 20 nm são as mais biocompatíveis.

Em relação as células tumorais, as análises de citotoxicidade realizadas em células HeLa (Figura 8), mostrou que as GNPs de tamanho de 20 e 30 nm apresentaram um maior efeito citotóxico quando comparado com as GNPs de tamanho de 10nm. Em adição, ambas as GNPs (20 nm e 30 nm) não apresentaram citotoxicidade de maneira dependente da concentração. Em contraste, as GNPs de tamanho de 10 nm diminuíram a viabilidade das células HeLa de uma forma dependente da concentração, quanto maior a concentração de GNPs menor a viabilidade, não apresentando citotoxicidade nas menores concentrações (2,2 e 4,4 µg/mL).

Da mesma forma, a citotoxicidade das GNPs também foi avaliada em células tumorais do tipo melanoma B16F10. Desta vez, nas células B16F10 (Figura 9), as GNPs de tamanho de 10 e 30 nm apresentaram maior efeito citotóxico do que as GNPs de tamanho 20 nm, principalmente para as concentrações de 2,2 a 8,75 µg/mL. As GNPs de tamanho de 20 nm não foram muito citotóxicas, apresentando nenhuma citotoxicidade na concentração de 2,2 µg/mL e muito baixa citotoxicidade nas demais concentrações. Nos três tamanho de GNPs a viabilidade das células B16F10 não foi de maneira dependente da concentração.

O interessante destes resultados é que para as células de câncer cervical de

HeLa, as GNPs que tiveram menor atividade citotóxicas foram as de tamanho de 10 nm, por outro lado para células de câncer do tipo melanoma B16F10, as GNPs de tamanho de 10 nm foram as que apresentaram maior atividade citotóxicas, mais uma vez reforçando nossa hipótese que em tipos celulares diferentes as GNPs terão atividades diferente.

Como pode ser visto na Figura 8, as células B16F10 mostraram uma maior resistência ao tratamento com GNPs, quando comparado com as células HeLa. Para células B16F10, a IC50 das GNPs de 10 nm, 20 nm e 30nm foi estimado em > 70 µg/mL. Em contraste, as células HeLa apresentaram valores de IC50 de 35 µg/mL (10 nm), 2,2 µg/mL (20 nm) e 4,4 µg/mL (30 nm). Chueh et al. 2014 demonstraram que as diferentes linhagens celulares são diferencialmente sensíveis aos efeitos citotóxicos das GNPs. Conforme comentado anteriormente, a quantidade de GNPs internalizadas é um fator crítico na determinação da sua citotoxicidade. Portanto, podemos sugerir que a quantidade de GNPs internalizadas foi maior nas células HeLa. As propriedades físico-químicas das GNPs também são um fator limitante para seu efeito citotóxico, (Pan et al. 2007; Cardoso Ávila et al. 2017). Estudos têm demonstrado que diferentes modificadores de superfície, como citrato, cisteína, glicose, biotina e brometo de cetiltrimetilamônio, têm uma influência direta na captação celular, mecanismos de tráfego, bem como na citotoxicidade de nanomateriais (Goodman et al. 2004; Connor et al. 2005; Murphy et al. 2008; Behzadi et al. 2017). Xiao-Dong Zhang et al. 2011 mostrou que a toxicidade das GNPs revestidas com PEG é complexa. Neste estudo, os autores mostraram que a toxicidade das GNPs de 10 nm e 60 nm foi maior do que os de 5 nm e 30 nm. Os autores concluem que a toxicidade das GNPs não depende do tamanho. Kumar et al. 2017 mostrou que o tamanho da GNPs tem influência direta no seu comportamento no sistema biológico. Outros estudos têm demonstrado que GNPs com menores tamanhos são mais susceptíveis a induzir necrose e GNPs com morfologias esféricas ou hexagonais são mais susceptíveis a induzir apoptose (Zhao et al. 2006; Mehrnia et al. 2017; Sun et al. 2018). Como observado neste estudo, GNPs de 20nm apresentou uma melhor resposta citotóxica, quando comparado com as outras GNPs. O menor efeito citotóxico sob as células não tumorais e a ótima interação com as células HeLa estão diretamente relacionado com as suas propriedades físico-química e também o tipo de célula deve ser considerado um fator importante nos estudos de citotoxicidade (Pan et al. 2007, 2012; Cai 2008; Coradeghini et al. 2013; Liu et al. 2013; Woźniak et al. 2017; Chugh et al. 2018; Singh

et al. 2018; Pourshohod et al. 2019).

Por tudo que foi relatado e por que já vem sendo descrito na literatura que as GNPs possuem um grande potencial para ser utilizado no tratamento, diagnóstico e monitoramento do câncer (Wang; Thanou, 2010; Bhowmik et al., 2017; Martinelli et al., 2019), nosso trabalho mostrou que além de tamanho, concentração, morfologia que já estão bem descrito na literatura, o tipo celular deva também ser levada em conta e que as GNPs possuem biocompatibilidade diferentes dependendo do tipo de células que são expostas. Por fim, por não serem as mais biocompatíveis em células normais e as mais citotóxicas em células cancerígenas, as GNPs de tamanho de 20 nm apresentam como as mais promissoras para um possível tratamento para o câncer cervical e de melanoma.

6. CONCLUSÃO

Nanopartículas de ouro (GNPs) com diferentes tamanhos (10 nm, 20 nm e 30 nm) foram sintetizadas com sucesso usando o método de Turkevich com propriedades físico-química satisfatórias, conforme mostrado pelas imagens TEM e análises espectrométricas. Os resultados mostraram maior biocompatibilidade das GNPs de 20 nm para eritrócitos humanos e fibroblastos. Em contraste, as GNPs de 30 nm se mostraram mais citotóxicas para as células não tumorais. Os ensaios de citotoxicidade mostraram que as células B16F10 foram mais resistentes ao tratamento com GNPs, quando comparado com as células HeLa. As GNPs de 20 nm apresentaram melhor atividade terapêutica antitumoral devido à sua menor citotoxicidade aos eritrócitos humanos e células não tumorais. A partir destes estudos nós concluímos que as GNPs de 20 nm podem ser uma excelente alternativa para o tratamento do câncer de colo uterino, na qual estas podem ser administradas com segurança na corrente sanguínea com mínimos efeitos tóxicos quando em contato com células não tumorais. Em adição, nossos resultados sugerem que além das propriedades físico-químicas dos nanomateriais, o tipo de célula também deve ser considerado um fator importante nos estudos de citotoxicidade. Para confirmar nossas hipóteses, sugerimos como trabalhos futuros, ensaios de captação celular, avaliação do mecanismo de morte e avaliação de outros parâmetros bioquímicos, bem como estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

Abdulkin P, Precht TL, Knappett BR, Skelton HE, Jefferson DA, Wheatley AEH. Systematic control of size and morphology in the synthesis of gold nanoparticles. Part Part Syst Ch Aract. 2014. 31:571 – 579. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300227>

Arvizo RR, Bhattacharyya S, Kudgus RA, Giri K, Bhattacharya R, Mukherjee P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2943-2970. doi:10.1039/c2cs15355f

Arunachalam K, Raghavendra R, Annamalai SK, Arunachalam AM. Diagnostics and therapeutic application of gold nanoparticles. Int J Pharm Pharm Sci. 2014, v. 6. n. 2. p. 74-87.

Badr G, Al-Sadoon MK, Rabah DM. Therapeutic efficacy and molecular mechanisms of snake (*Walterinnesia aegyptia*) venom-loaded silica nanoparticles in the treatment of breast cancer and prostate cancer bearing experimental mouse models. Free Radic Biol Med. 2013. v. 65. p.175–189.

Baskar G, Garrick BG, Lalitha K, Chamundeeswari M. Gold nanoparticle mediated delivery of fungal asparaginase against cancer cells. J Drug Deliv Sci Technol. 2018. 44:498–504. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.02.007>

Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Annu Rev Pathol. 2014. 9:239-71. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104658.

Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, Brown D, Alkilany AM, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. Chem Soc Rev. 2017. 46:4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>

Bhowmik T, Saha PP, Sarkar A, Gomes A. Evaluation of cytotoxicity of a purified venom protein from *Naja kaouthia* (NKCT1) using gold nanoparticles for targeted delivery to cancer cell. Chemico-Biological Interactions. 2017 n. 261, p. 35-49.

Birhanu G, Javar HA, Seyedjafari E, Karimi AZ. Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017.v. 88, p. 635–643.

Blanco E, Shen H, Ferrari M. Perspective Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. Nat Biotechnol. 2015. 33:941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

Brasileiro Filho G. et al. Bogliolo patologia. 9ª edição, 2016.

Cai W. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. Nanotechnol Sci

Appl. 2008. 1:17–32. <https://doi.org/10.2147/NSA.S3788>

Cancino J, Nobre TM, Oliveira Jr ON, Machado SAS, Zucolotto V. A new strategy to investigate the toxicity of nanomaterials using Langmuir monolayers as membrane models. *Nanotoxicology*. 2013. 7:1, 61-70, DOI: 10.3109/17435390.2011.629748

Cancino J, Marangoni VS, Zucolotto V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações [Nanotechnology in medicine: concepts and concerns]. *Quim. Nova*. 2014. 37, 521–526. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140086>

Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, Scalisi A, McCubrey JA, Maestro R, Spandidos DA, Fenga C, Libra M. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep*. 2014. Mar;31(3):1079-82. doi: 10.3892/or.2014.2977.

Cardoso E, Tezza G, Torres E, et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*. 2014. 766–767:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.05.009>

Chiriboga L, Meehan S, Osman I, Glick M, de la Cruz G, Howell BS, Friedman-Jiménez G, Schneider RJ, Jamal S. Endothelin-1 in the tumor microenvironment correlates with melanoma invasion. *Melanoma Res*. 2016. Jun;26(3):236-44. doi: 10.1097/CMR.000000000000235.

Chugh H, Sood D, Chandra I, Tomar V, Dhawan G, Chandra R. Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano- medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018. 46:1210–1220. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1449118>.

Chueh PJ, Liang RY, Lee YH, Zeng ZM, Chuang SM. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *J Hazard Mater*. 2014. 264:303–312. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.031>

Connor EE, Mwamuka J, Gole A. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1:325– 327. 2005. <https://doi.org/10.1002/smll.200400093>

Coradeghini R, Gioria S, García CP, Nativo P, Franchini F, Gilliland D, Ponti J, Rossi F. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol Lett*. 2013. 217:205–216. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.022>

Devi S, Singh B, Paul AK, Tyagi S. Highly sensitive and selective detection of trinitrotoluene using cysteine-capped gold nanoparticles. *Anal Methods*. 2016. 8:4398–4405. <https://doi.org/10.1039/c6ay01036a>

Elbially NS, Fathy MM, Khalil WM. Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Int J Pharm*. 2016. 490:190–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.032>

Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* 2006. 35, 209–217. <https://doi.org/10.1039/b514191e>

Farooq MU, Novosad V, Rozhkova EA, Wali H, Ali A, Fateh AA, Neogi PB, Neogi A, Wang Z. Gold nanoparticles- enabled efficient dual delivery of anticancer therapeutics to HeLa cells. *Sci Rep.* 2018. 8:2907. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21331-y>

Ferreira GK, Cardoso E, Vuolo FS, Michels M, Zanoni ET, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Dal-Pizzol F, Rezin GT, Streck EL, Silva Paula MM. Gold nanoparticles alter parameters of oxidative stress and energy metabolism in organs of adult rats. *Biochem Cell Biol.* 2015. 93:548–557. <https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0030>

Feuser PE, Bubniak LDS, Silva MCDS et al. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. *Eur Polym J.* 2015. 68:355–365. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.029>

Friedman JH. Multivariate Adaptive Regression Splines. *Ann. Stat.* 1991. 19, 141–156. <https://doi.org/10.1201/9780367816377-7>

Gao W, Xu K, Ji L, Tang B. Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicology Letters.* 2011. n. 205, p. 86–95.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008. v. 60, p. 1307-1315.

Goodman CM, Mccusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 2004. 15:897–900. <https://doi.org/10.1021/bc049951i>

Grzelczak M, Pérez-juste J, Mulvaney P, Liz-marzán LM. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev.* 2008. 37:1783–1791. <https://doi.org/10.1039/b711490g>

Guo J, Rahme K, He Y, Li LL, Holmes J, O'driscoll C. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. *Int J Nanomedicine.* 2017. 12:6131–6152. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140772>

Habibi N, Quevedo DF, Gregory JV, Lahann J. Emerging methods in therapeutics using multifunctional nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2020. 12, 1–22. <https://doi.org/10.1002/wnan.1625>

Hauptenthal DPS, Possato JC, Zaccaron RP. Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in mdx mice. *J Drug Target.* 2019. 0:1–9. <https://doi.org/10.1080/1061186 x.2019.1613408>, 28.

He Z, Li C, Zhang X, Zhong R, Wang H, Liu J, Du L. The effects of gold nanoparticles on the human blood functions. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018. 46:720–726. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468769>

Huang X, El-sayed M. A.; Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research.* 2010. n. 1, p. 13-28.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma> >. Acesso em: 17 jun. 2020.

INVITROGEN. Alamarblue® Assay. 2007. US PAT. NO 5501959 1–27.

Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management. *Seminars in Oncology Nursing.* 2019. n. 35, p. 166-174.

Kim A, Shin TH, Shin SM, Pham CD, Choi DK, Kwon MH, Kim YS. Cellular internalization mechanism and intracellular trafficking of filamentous M13 phages displaying a cell-penetrating transbody and TAT peptide. *PLoS One.* 2012;7(12):e51813. doi: 10.1371/journal.pone.0051813.

Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma* 2016. 63:510-7. doi: 10.4149/neo_2016_403

Kulhari H, Pooja D, Shrivastava S, Naidu VGM, Sistla R. Peptide conjugated polymeric nanoparticles as a carrier for targeted delivery of docetaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014. n.117, p. 166–173.

Kumar D, Mutreja I, Chitcholtan K, Sykes P. Cytotoxicity and cellular uptake of different sized gold nanoparticles in ovarian cancer cells. *Nanotechnology.* 2017. 28:475101. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa935e>

Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, Urayama A, Vergara L, Kogan MJ, Soto C. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010. 393:649–655. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.046>

Lawrence, M., Stojanov, P., Polak, P. et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013. 499, 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature12213>

Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018.Apr;52(4):1071-1080. doi: 10.3892/ijo.2018.4287.

Li X, Hu Z, Ma J, Wang X, Zhang Y, Wang W, Yuan Z. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles. *Colloids*

Surf B: Biointerfaces. 2018. 167:260–266.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.005>

Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2007. 58:3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>

Liu X, Chen Y, Li H, Huang N, Jin Q, Ren K, Ji J. Enhanced retention and cellular uptake of nanoparticles in tumors by controlling their aggregation behavior. *ACS Nano*. 2013. 7:6244–6257. <https://doi.org/10.1021/nn402201w>

Lopez-Chaves C, Soto-Alvaredo J, Montes-Bayon M, Bettmer J, Llopis J, Sanchez-Gonzalez C. Gold nanoparticles: distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2018. 14:1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.011>

Lungu, I.I.; Grumezescu, A.M.; Volceanov, A.; Andronescu, E. Nanobiomaterials Used in Cancer Therapy: An Up-To-Date Overview. *Molecules*. 2019. 24, 3547.

Mabeta P. Paradigms of vascularization in melanoma: Clinical significance and potential for therapeutic targeting. *Biomed Pharmacother*. 2020. Jul;127:110135. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110135. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32334374.

Mailänder V, Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*. 2009. Sep 14;10(9):2379-400. doi: 10.1021/bm900266r

Mandal D, Maran A, Yaszemski MJ, Bolander ME, Sarkar G. Cellular uptake of gold nanoparticles directly cross-linked with carrier peptides by osteosarcoma cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2009. Jan;20(1):347-50. doi: 10.1007/s10856-008-3588-x.

Mansoori, AG. Advances in Atomic & Molecular Nanotechnology. *Nanotechnology, United Nations Tech Monitor*. 2002. Sep-Oct. n.1, p. 53-59,

Martinelli, C. Pucci, C.; Ciofani, G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioeng*. 2019. 3, 011502.

Maurea, N.; Coppola, C.; Ragone, G.; Frasci, G.; Bonelli, A.; Romano, C.; Laffaioli, R.V. Women survive breast cancer but fall victim to heart failure: the shadows and lights of targeted therapy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2010. v. 11, n.12, p. 861-868.

Mazulkim, DB. Design and fabrication of plasmonic nanostructures for applications in diffractive optics. Tese de doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

Mehrnia SS, Hashemi B, Mowla SJ, Arbabi A. Enhancing the effect of 4 MeV electron beam using gold nanoparticles in breast cancer cells. *Phys Medica*. 2017. 35:18–24

Millet A, Martin AR, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. Metastatic Melanoma: Insights into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Med. Res. Rev*. 2017.

37, 98–148. doi: 10.1002/med.21404

Ministério da Saúde. Portaria nº 357 de 8 de abril de 2013: Aprova as diretrizes diagnósticas e terapêuticas do melanoma maligno cutâneo. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html. Acesso em 07 de setembro de 2020.

Mody, V.V.; Siwale, R.; Singh, A.; Mody, H.R. Introduction to metallic nanoparticles. *J.Pharm. BioalliedSci.* 2010. n2, p.282–289.

Mohammad I. Gold nanoparticle: an efficient carrier for MCP I of *Carica papaya* seeds extract as an innovative male contraceptive in albino rats. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019. 52: 942–956. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.06.010>

Mohan JC, Praveen G, Chennazhi KP, Jayakumar R, Nair SV. Functionalised gold nanoparticles for selective induction of in vitro apoptosis among human cancer cell lines. *J Exp Nanosci.* 2013. 8:32 – 45. <https://doi.org/10.1080/17458080.2011.557841>

Mossmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1993. v. 65. p. 55–63.

Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, Sisco PN, Alkilany AM, Goldsmith EC, Baxter SC. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Acc Chem Res.* 2008. 41:1721–1730

Nghiem THL, La TH, Vu XH et al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2010. 1:025009. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/1/2/025009>

Ojea-Jimenez I, Romero FM, Bastuss NG, Puentes V. Small gold nanoparticles synthesized with sodium citrate and heavy water: insights into the reaction mechanism. *J Phys Chem C.* 2010. 114:1800–1804. <https://doi.org/10.1021/jp9091305>

OMS. Health topics: Cancer. 2018. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em set. 2020.

Pan Y, Bartneck M, Jahnen-Dechent W. Cytotoxicity of gold nanoparticles. *Methods Enzymol.* 2012. 509:225–242. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00012-5>

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnen-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007. 3:1941–1949. <https://doi.org/10.1002/smll.200700378>

Park JW, Shumaker-Parry JS. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2014. 136:1907– 1921. <https://doi.org/10.1021/ja4097384>

Patterson, J. W. Weedon's Skin Pathology. Fourth Edition. Churchill Livingstone, 2016.

Pflugfelder, A., Kochs, C., Blum, A., Capellaro, M., Dettenborn, T., Dill, D., Dippel, E., Eigentler, T., Feyer, P., Follmann, M., Frerich, B., Ganten, M., Malignant Melanoma S3-Guideline “ Diagnosis , Therapy and Follow-up of Melanoma .” 2013. Guideline Program in Oncology, German Cancer Society and German Cancer Aid.
<https://doi.org/10.1111/ddg.12113>

Pourshohod A, Jamalán M, Zeinali M, Ghanemi M, Kheirollah A. Enhancement of X-ray radiotherapy by specific delivery of ZHER2 affibody-conjugated gold nanoparticles to HER2-positive malignant cells. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2019. 52: 934–941. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.039>

Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, Blumenthal R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst.* 2009. 26:523–580.
<https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v26.i6.10>

Raghavendra R, Arunachalam K, Annamalai SK, Arunachalam AM. Diagnostics and therapeutic application of gold nanoparticles. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014. 6:74–87

Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin.* 2000. Jul-Aug;50(4):215-36; quiz 237-40. doi: 10.3322/canjclin.50.4.215. PMID: 10986965.

Roskoski R Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010. Aug 27;399(3):313-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.092. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20674547.

Rossi-Bergmann, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. *Ciência e cultura.* v. 60, n. 2, São Paulo, 2008.

Sindhu K, Rajaram A, Sreeram KJ, Rajaram R. Curcumin conjugated gold nanoparticle synthesis and its biocompatibility. *RSC Adv.* 2014. 4:1808–1818.
<https://doi.org/10.1039/c3ra45345f>

Skin Cancer Foundation. Skin Cancer Facts & Statistics: Melanoma. April 2020. Disponível em: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts/#melanoma>.

Shilo M, Berenstein P, Dreifuss T, Nash Y, Goldsmith G, Kazimirsky G, Motiei M, Frenkel D, Brodieb C, Popovtzer R. Insulin-coated gold nanoparticles as a new concept for personalized and adjustable glucose regulation. *Nanoscale.* 2015. n.7, 20489-20496. <https://doi.org/10.1039/C5NR04881H>

Shrikhande, SS.; Jain, DS.; Athawale, RB, Bajaj AN; Goel, P; Kamran, Z; Nikam, Y; Gude, R. Evaluation of anti-metastatic potential of Cisplatin polymeric nanocarriers on B16F10 melanoma cells. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2015. n. 23, p. 341-351.

Singh P, Pandit S, Mokkaapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold

nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *Int J Mol Sci.* 2018. 19:1979. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>

Sun H, Jia J, Jiang C, Zhai S. Gold nanoparticle-induced cell death and potential applications in nanomedicine. *Int J Mol Sci.* 2018. 19:754. <https://doi.org/10.3390/ijms19030754>

Tiloke C, Phulukdaree A, Anand K, Gengan RM, Chuturgoon AA. Moringa oleifera gold nanoparticles modulate onco- genes, tumor suppressor genes, and caspase-9 splice variants in A549 cells. *J Cell Biochem.* 2016. 2314:2302–2314. <https://doi.org/10.1002/jcb.25528>

Toma HE, Bonifácio LS. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. *Quim Nova.* 2015. 28:897–900. <https://doi.org/10.16923/reb.v13i1.548>

Tomić S, Dokić J, Vasilijć S, et al. Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. *PLoS One.* 2014. 9:e96584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951. 11:55–75

Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small.* 2010. 6:12–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>

Villiers C, Freitas H, Couderc R, Villiers MB, Marche P. Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *J Nanopart Res* 12: 55–60.

Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. *Curr Probl Cancer.* 2018. n. 42, p. 457-465.

Wang M.; Thanou, M. Targeting nanoparticles to câncer. *Pharmacological Research.* 2010. v. 62, p. 90–99.

Wang W, Chen Q, Jiang C, et al. One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). *Colloids Surf A Physico chem Eng Asp.* 2007. 301:73–79. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.12.037>

Wang W, Ding X, Xu Q, Wang J, Wang L, Lou X. Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2016. 148: 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.021>

Woźniak A, Malankowska A, Nowaczyk G, Grześkowiak BF, Tuśnio K, Słomski R, Zaleska-Medynska A, Jurga S. Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2017. 28:92. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y>

Zhang J, Chaker M, Ma D, Riabinina D. Influence of sodium citrate concentration on morphology transformation of gold nanoparticles during laser irradiation. *Proc Int Conf Nanotechnol Fundam Appl*. 2010. p.1–6.

Zhang XD, Wu D, Shen X, Liu PX, Yang N, Zhao B, Zhang H, Sun YM, Zhang LA, Fan FY. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2011. 6:2071-81. doi: 10.2147/IJN.S21657.

Zhao H, Olubajo O, Song Z, Sims AL, Person TE, Lawal RA, Holley LDA. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. *Bioorg Chem*. 2006. 34:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2005.10.004>