



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

THATIANE SANDIELEN LIMA SOARES

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O RECOBRIMENTO DE
NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES COM ÁCIDO FÓLICO E AS
PROPRIEDADES DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR E BIOCOMPATIBILIDADE**

BRASÍLIA, 2018

THATIANE SANDIELEN LIMA SOARES

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O RECOBRIMENTO DE
NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES COM ÁCIDO FÓLICO E AS
PROPRIEDADES DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR E BIOCOMPATIBILIDADE**

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

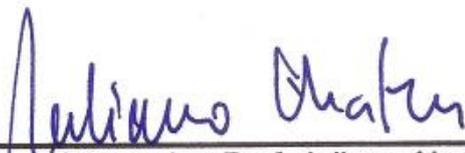
Orientador: Prof. Juliano Alexandre Chaker

BRASÍLIA, 2018

THATIANE SANDIELEN LIMA SOARES

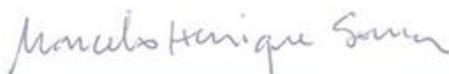
**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O RECOBRIMENTO DE
NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES COM ÁCIDO FÓLICO E AS
PROPRIEDADES DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR E BIOCOMPATIBILIDADE**

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Juliano Alexandre Chaker

(FCE/ Universidade de Brasília)



Prof. Marcelo Henrique Sousa

(FCE/ Universidade de Brasília)



MSc. Mac-Kedson Medeiros Sálviano Santos

(Centro Universitário Unieuro)

Brasília, 2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Le Lima Soares, Thatiane Sandielen
 Estudo da correlação do recobrimento de nanopartículas
 luminescentes com ácido fólico e as propriedades de
 internalização celular e biocompatibilidade / Thatiane
 Sandielen Lima Soares; orientador Juliano Alexandre Chaker.
-- Brasília, 2018.
 36 p.

 Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
 Brasília, 2018.

 1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Terapia
 Fotodinâmica. 4. Ensaio Biológico. I. Chaker, Juliano
 Alexandre, orient. II. Título.

Devemos estar dispostos a nos livrar da vida que planejamos para ter a vida que nos espera.

– Joseph Campbell

Dedico este trabalho em memória de José Pereira Soares Filho, amado pai e grande incentivador de todos os meus sonhos e objetivos, obrigada por me educar, amar e me ensinar a ser uma pessoa melhor.

À minha amada mãe, Elis Regina Lima Soares, sua força, determinação e coragem me inspiram diariamente, obrigada por ser meu porto seguro.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVOS.....	20
5. METODOLOGIA	20
5.1. Síntese das Nanopartículas	20
5.2. Ensaio de Caracterização	22
5.3. Ensaio Biológico	22
5.4. Ensaio de Toxicidade	23
5.5. Ensaio de Internalização	24
5.6. Análise de Dados	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1. Caracterização	24
6.2. Biocompatibilidade	27
6.3. Internalização	30
7. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

O câncer é uma doença na qual ocorre a proliferação desordenada de células indiferenciadas, decorrente de mutações genéticas. Seu tratamento é feito por quimioterapia, radioterapia ou cirurgia, a depender da localidade e estadiamento. Devido à gravidade da doença e as complicações de seu tratamento, pesquisas são realizadas com o objetivo de aperfeiçoar este tratamento, é nesse cenário que o ramo da nanobiotecnologia é promissora, e dentro desse ramo se encontra o estudo das nanopartículas. Para esta pesquisa, foram sintetizadas nanopartículas esféricas de sílica pelo método Stöber, as quais foram dopadas com ftalocianina de zinco e recobertas com PVP, e PVP e ácido fólico. As nanopartículas apresentam um tamanho médio de 61nm, com potencial zeta médio de -30,7mV, as imagens do MET demonstram que elas estão agregadas e de acordo com gráficos do FTIR o recobrimento com PVP e ácido fólico foi realizado com sucesso. As nanopartículas sem recobrimento apresentaram uma melhor biocompatibilidade em relação as recobertas. Quanto a internalização, as imagens da microscopia confocal demonstraram que as nanopartículas de sílica recobertas com PVP e ácido fólico foram internalizadas pelas células CT-26 e que as mesmas se encontram no citoplasma destas células, as demais formulações não foram internalizadas. Diante disto, tem-se que o recobrimento com ácido fólico favoreceu a internalização das nanopartículas de sílica, no entanto, a biocompatibilidade pode ser otimizada.

Palavras chave: Nanotecnologia, Nanopartículas, Terapia Fotodinâmica, Ensaios Biológicos.

ABSTRACT

Cancer is a disease in which disordered proliferation of undifferentiated cells occurs due to genetic mutations. Your treatment is done by chemotherapy, radiotherapy or surgery, depending on the locale and staging. Due to the severity of the disease and the complications of its treatment, research is carried out with the aim of perfecting this treatment, it is in this scenario that the branch of nanobiotechnology is promising, and within this branch is the study of nanoparticles. For this research, spherical silica nanoparticles were synthesized by the Stöber method, which were doped with zinc phthalocyanine and coated with PVP, and PVP and folic acid. The nanoparticles have an average size of 61 nm, with a mean zeta potential of -30.7 mV, the TEM images show that they are aggregated and according to FTIR plots the PVP and folic acid coating was successfully performed. The nanoparticles without coating presented better biocompatibility than the coated ones. As for the internalization, the confocal microscopy images showed that the silica nanoparticles coated with PVP and folic acid were internalized by the CT-26 cells and that they are found in the cytoplasm of these cells, the other formulations were not internalized. In view of this, it has been shown that the folic acid coating favored the internalization of the silica nanoparticles, however, the biocompatibility can be optimized.

Keywords: Nanotechnology, Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Biological Assays.

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Valor médio do potencial zeta (Zt) e do diâmetro hidrodinâmico (DH).....	22
Tabela II – Identificação espectrofotométrica de grupos funcionais.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura química do ácido fólico. Fonte: www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/folicacid	14
Figura 02 – Estrutura química do ácido fólico. Fonte: www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/zincphthalocyanine	15
Figura 03 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2018.....	16
Figura 04 – Ilustração de uma possível representação da estrutura de uma nanopartículas esférica de sílica. Fonte: MUTTI, 2015	17
Figura 05 – Esquema do método de síntese das nanopartículas. Fonte: autor.....	21
Figura 06 – Esquema do recobrimento das nanopartículas. Fonte: autor.....	21
Figura 07 – Nanopartículas de sílica sem recobrimento visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	25
Figura 08 – Espectro do FTIR das nanopartículas de sílica sem recobrimento.....	26
Figura 09 – Espectro do FTIR das nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina de zinco e recobertas com PVP e ácido fólico.....	26
Figura 10 – Ensaio de toxicidade de nanopartículas de sílica sem recobrimento, em células da linhagem NIH 3T3.....	28
Figura 11 – Ensaio de toxicidade de nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP, em células da linhagem NIH 3T3.....	28

Figura 12 – Ensaio de toxicidade de nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP e ácido fólico, em células da linhagem NIH 3T3..... 29

Figura 13 – Visualização por microscopia confocal da internalização das nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP e ácido fólico pelas células da linhagem CT-26. A: Sobreposição das imagens B e C, onde em azul é o núcleo das células e em vermelho as nanopartículas; B: Em destaque o núcleo das células coradas pelo corante DAPI; C: Em destaque as nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina no citoplasma das células..... 30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AoT – (*Bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate*)
- CT-26 – Linhagem Celular De Câncer Colorretal Murino
- DAPI – *4',6-diamidino-2-fenilindol*
- DH – Tamanho Hidrodinâmico
- DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz
- DMEN – Modificação do Meio *Eagle Dulbecco*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FR – Receptor de Folato Ligado a *Glicosilfosfatidilinositol* de Alta Afinidade
- FTIR – *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MTT – (*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]*)
- NIH 3T3 – Linhagem Celular de Fibroblastos Murino
- PBS – Solução Tampão Fosfato
- PVP – *poly(vinylpyrrolidone)*
- SFB – Soro Fetal Bovino
- TEOS – *tetraethylorthosilicate*
- TFD – Terapia Fotodinâmica
- THF – *tetrahidrofurano*
- Zt – Potencial Zeta

1. INTRODUÇÃO

Os quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer são drogas geralmente citotóxicas, de baixa solubilidade e pouca seletividade, por isso, necessitam ser administrados em doses elevadas e geram efeitos colaterais indesejados. Uma alternativa para este problema, é o desenvolvimento de nanocarreadores, como os dispositivos com nanopartículas de sílica funcionalizadas, capazes de transportar e liberar estas drogas com maior seletividade, segurança e com menores efeitos colaterais.

As nanopartículas de sílica possuem grande utilidade no campo biomédico, são aplicadas como parte de dispositivo de diagnóstico, bio-sensoriamento, entrega direcionada de drogas, e fototerapia. Sua composição pode ser alterada a fim de atingir coeficientes de partição e permeabilidades específicas, aumentando assim sua biodisponibilidade no organismo e, conseqüentemente, sua eficácia.

As nanopartículas de sílica possuem características que as tornam bastante atrativas, como sua grande área de superfície, tamanho ajustável, elevada capacidade de carregamento de moléculas ativas, alta biocompatibilidade, efeito de permeação e retenção nos tumores sólidos (ZHANG et al.,2013), facilidade de escalabilidade, boa estabilidade química, térmica, fisiológica (para a degradação enzimática) e também, são passíveis de modificações químicas em suas superfícies e composição interna (BAEZA; COLILLA; VALLET-REGÍ, 2014; WONG et al.,2017a), o que as tornam nanocarreadores ideais.

A superfície de uma partícula é o principal meio de interação com o ambiente, esta pode ser modificada para controlar sua seletividade e como o ambiente responde diante de sua presença (BAEZA; COLILLA; VALLET-REGÍ, 2014), nesse sentido, é importante pensar na relação superfície/volume das nanopartículas de modo que as modificações aumentem, o máximo possível, o tempo que elas permanecem em circulação para garantir o acúmulo nos tumores, sua seletividade e minimizar sua destruição pelo sistema imune.

Nanomateriais para aplicações biomédicas podem ser obtidos pela funcionalização das nanopartículas de sílica (SONG; YANG, 2015), pois a superfície do óxido de silício é reativo e pode sofrer diferentes reações e interações químicas que permitem a fixação de diferentes grupos funcionais que podem ser aplicados ao

direcionamento às células alvo, liberação modificada de fármacos e como fotossensibilizadores moleculares para terapia fotodinâmica (WONG et al., 2017 b).

Em relação a funcionalização das nanopartículas visando o direcionamento da entrega seletiva de fármacos, várias estratégias são usadas para tanto, entre elas a funcionalização com anticorpos, ou fragmentos de anticorpos, peptídeos, ou proteínas inteiras e diferentes ligantes de receptores celulares como o ácido fólico. O ácido fólico é uma molécula pequena, importante para o ciclo celular das células e tem sido explorado como ligante de nanopartículas visando o direcionamento destas às células alvo (BAZAK et al., 2014).

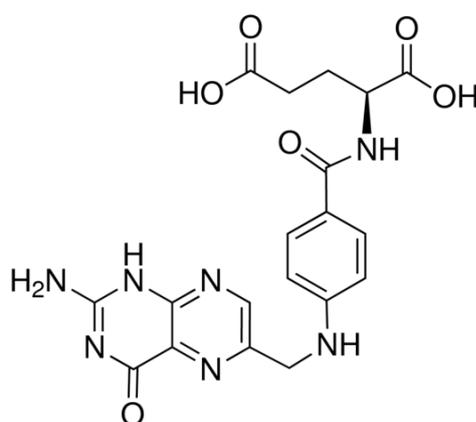


FIGURA 01 – Estrutura química do ácido fólico. **Fonte:** www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/folicacid.

Como dito anteriormente, as nanopartículas de sílica podem ser utilizadas para a terapia fotodinâmica, para tanto, as mesmas precisam de um fotossensibilizador impregnado em sua superfície. A ftalocianina de zinco (**Figura 02**) é um fotossensibilizador que possui a capacidade de absorver comprimentos de onda na faixa de 650 a 850 nm e, por reação fotoquímica, resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (WANG et al., 2010).

Com este trabalho pretende-se estudar os parâmetros de síntese e funcionalização de nanopartículas de sílica com ácido fólico visando controle de forma e carga de superfície. Espera-se obter nanopartículas de óxido de silício recobertas com ácido fólico, e que esta funcionalização possa diminuir a toxicidade em cultura celular e favorecer o direcionamento seletivo em células alvo, e que assim como a forma esférica da nanopartícula, a compatibilidade do ácido fólico com tecidos tumorais favoreçam a internalização celular.

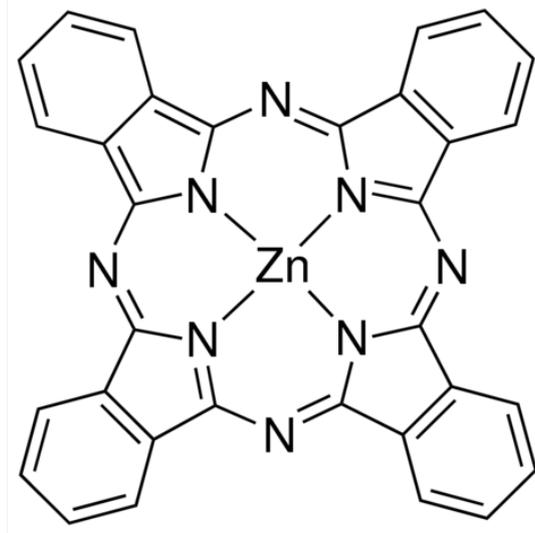


FIGURA 02 - Estrutura química do ácido fólico. **Fonte:** www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/zincphthalocyanine.

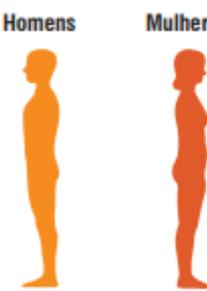
2. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer é uma das principais causas de óbitos em humanos. É uma doença que resulta da proliferação desordenada de células anormais, esta proliferação é decorrente de mutações no material genético, as quais possuem múltiplos fatores influenciadores, tais como fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. Uma das principais características do câncer é que as células cancerosas possuem modificações nos mecanismos reguladores do ciclo celular, além da habilidade de invadir tecidos vizinhos por meio da degradação da lâmina basal, sendo que essa característica pode originar o aparecimento de vários focos neoplásicos metastáticos (RODRIGUES, 2014).

Segundo o INCA, a estimativa é que para o biênio 2018-2019, no Brasil, haja a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. Como demonstra a **Figura 03**, os cânceres de próstata, para homens, e de mama, para mulheres, serão os mais incidentes (INCA, 2017).

Devido à gravidade desta doença grandes esforços são feitos com a finalidade de melhorar o tratamento do câncer, sendo que este pode ser tratado com o uso de quimioterapia, radioterapia, cirurgia, ou ainda, combinações destes tratamento a depender do estadiamento da doença (RODRIGUES, 2014). No entanto, nem todos

os casos são passíveis de cirurgia, e tanto a quimioterapia quanto a radioterapia podem ser debilitantes por si mesmos.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FIGURA 03 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. **Fonte:** Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa Câncer, 2018.

Os quimioterápicos são um grupo de drogas com alta eficácia em matar células cancerosas, entretanto são poucos seletivos, o que leva a toxicidade induzida por drogas em tecidos saudáveis (BAZAK et al., 2014), é dessa inespecificidade no alvo de ação que vem os efeitos colaterais, por vezes debilitantes, o que acaba limitando o uso destas drogas na terapia anticâncer, por isso pesquisadores em todo mundo estão em busca de alternativas que melhorem a seletividade dos quimioterápicos e a nanobiotecnologia tem sido um ramo promissor nesse aspecto.

Além da baixa seletividade, os quimioterápicos nem sempre conseguem matar todas as células neoplásicas, fazendo com que as sobreviventes criem mecanismos de resistência aos antineoplásicos, por isso, se faz necessário o uso de novos sistemas de tratamento que levem ao acúmulo de droga no local do tumor, de forma mais específica e segura para que se aumente a eficiência e segurança da quimioterapia, e é por isso que a entrega modificada de fármacos usando nanopartículas tem ganhado grande foco nas pesquisas biomédicas (DE OLIVEIRA et al., 2016).

As nanopartículas têm se mostrado uma ferramenta bastante útil no tratamento do câncer, tanto que a FDA (*Food and Drug Administration*) já aprovou duas nanopartículas comercialmente disponíveis (*Doxil* e *Abraxane*), ambas demonstraram a redução do efeito colateral em comparação à quimioterapia convencional, sem o

uso de nanossistemas (DE OLIVEIRA et al., 2016). Uma das características que tornam as nanopartículas tão atrativas é o fato de que seu tamanho reduzido propicia o efeito de permeação e retenção aumentada (EPR) em tumores sólidos, sendo que o tamanho ideal para melhorar este efeito é menor que 100 nm (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Dentre os vários tipos de nanopartículas, as de sílica são um grande destaque, isto devido a estabilidade química, mecânica, térmica, biológica, além da alta capacidade de reatividade superficial e da biocompatibilidade que a sílica possui. Outras vantagens das nanopartículas de sílica é que estas são de produção simples, com uma boa relação custo-eficiência e de fabricação escalável (SILVA FILHO, 2016).

Para compreender as muitas características das nanopartículas de sílica é preciso entender mais sobre este material. A sílica é um óxido inorgânico formado por tetraedros de SiO_4^{4-} , essas unidade tetraédricas estão arranjadas de maneira aleatória em seu interior e ligadas por pontes de siloxanos $=\text{Si-O-Si}=\text{}$, já em seu meio externo, estão presentes os grupos silanóis, que são grupos hidroxilas unidos ao silício, preenchendo assim, seu número de coordenação (MUTTI, 2015). A característica de alta reatividade das nanopartículas de sílica são devidas aos grupos silanóis.

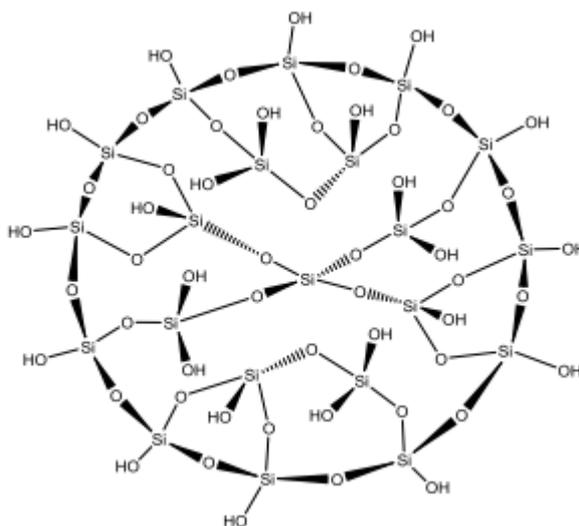


FIGURA 04 – Ilustração de uma possível representação da estrutura de uma nanopartículas esférica de sílica. **Fonte:** MUTTI, 2015.

As nanopartículas de sílica por si só já apresentam muitas vantagens, porém, a fim de atender melhor as condições biológicas e de direcioná-las a alvos específicos, estas são funcionalizadas. A adição de ligantes à superfície das nanopartículas de

sílica permite o direcionamento das mesmas às células alvo, ou ainda a compartimentos subcelulares, diminuindo a exposição sistêmica de drogas encapsuladas, o que leva a redução da toxicidade indesejada dos quimioterápicos (BAZAK et al., 2014) e uma maior segurança do tratamento.

Para além da segurança terapêutica que o direcionamento das nanopartículas traz, o seu uso pode ainda suprimir a resistência a múltiplas drogas, já que elas evitam o efluxo mediado pela glicoproteína P (BAZAK et al., 2014).

O ácido fólico é componente essencial para o ciclo celular, pois é utilizado para a biossíntese de purinas e pirimidinas, por isso a sua captação é facilitada por receptores, por isso seu uso visando o direcionamento das nanopartículas tem sido explorado. Dentre os receptores de ácido fólico, o receptor de folato ligado a *glicosilfosfatidilinositol* de alta afinidade (FR) possui grande destaque, embora esse receptor tenha uma distribuição limitada, o FR acaba desempenhando um papel muito importante para o desenvolvimento de tumores, por isso ele é suprarregulado em alguns tipos de cânceres (BAZAK et al., 2014). O FR é capaz de transportar ácido fólico, mesmo em suas formas não fisiológicas e até nanoconjugados ligados ao folato (BAZAK et al., 2014).

As vantagens da funcionalização de nanopartículas com ácido fólico vão muito além da sua interação com o FR, já que está é uma molécula estável, relativamente barata e por seu baixo peso molecular, possui a propriedade química de conjugação simples e não imunogenicidade para o funcionamento do ciclo celular, quando internalizado, o mesmo costuma ser retido em uma vesícula endocítica ou mesmo liberado no citoplasma, ao contrário de outros ligantes, que por vezes, após a internalização, são levados para dentro de lisossomos para a sua destruição (BAZAK et al., 2014).

As nanopartículas, podem ser veículos de terapias combinadas, ou seja, além de direcionar o tratamento quimioterápico, elas podem ser utilizadas também para a terapia fotodinâmica (TFD). Para cânceres refratários e recidivantes, essa terapia combinada tem sido muito utilizada e se mostrado bem eficaz (WONG et al., 2017a).

A terapia fotodinâmica tem se mostrado um tratamento promissor, não invasivo (CROISSANT et al., 2018), no qual se há a produção de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto, um composto citotóxico que causa danos às células cancerosas (WONG et al., 2017a). A TFD, pode até ser usada como uma modalidade

de tratamento isolado, entretanto em combinação com outros métodos, como por exemplo, os quimioterápicos, que resultam em um tratamento mais eficaz por induzir diferentes vias citotóxicas ao tumor (WONG et al.,2017a).

As nanopartículas de sílica são um dos nanocarreadores ideais para a TFD, pois podem tolerar várias condições de reações químicas, sendo que para se alcançar a TFD estas nanopartículas precisam ser carregadas com fotossensibilizadores, como as hematoporfirinas e ftalocianinas (WONG et al.,2017a). Fotossensibilizadores formulados em nanopartículas são mais estáveis em meio biológico, tem seu tempo de circulação melhorado e sua seletividade otimizada graças ao efeito de permeação e retenção aumentada (EPR) (CROISSANT et al., 2018).

Para incrementar as nanopartículas voltadas a TFD, essas podem ser sintetizadas como luminescentes, as mesmas podem ser dopadas com terras raras, elementos que possuem propriedades ópticas resultantes do preenchimento parcial dos orbitais 4f (SOUSA FILHO et al., 2015). A vantagem de se usar nanopartículas de sílica luminescentes na TFD é que quando expostas a uma certa radiação as nanopartículas emitem luminescência, que podem ser capazes de ativar o agente fotossensibilizador incorporado a essas nanopartículas (ROZ et al., 2015).

3. JUSTIFICATIVA

As drogas antitumorais são de baixa seletividade, o que leva a geração de efeitos colaterais indesejados que geram desconforto e não adesão ao tratamento. Adicionalmente, a baixa eficiência dos fármacos convencionais, resultado de seletividade reduzida, também é um fator que revela a necessidade do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas com maior eficiência e baixo efeito colateral.

Nesse sentido, o estudo de nanopartículas de óxido de silício com superfícies funcionalizadas é promissor. Além do aspecto inovador do tema, o presente plano de trabalho envolve a maioria das etapas necessárias para a aplicação do material como droga quimioterápica, desde o preparo até os testes biológicos. Neste trabalho serão desenvolvidos conceitos químicos, através do estudo das reações de síntese de preparo dos materiais. Conceitos físicos, envolvidos nos ensaios analíticos que serão

utilizados na caracterização das amostras. E conceitos de biologia, contido dos experimentos com cultura de células, viabilidade celular e internalização.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é obter nanopartículas esféricas de óxido de silício dopadas com terras raras e recobertas com ácido fólico visando favorecer a internalização por células tumorais. Além disso pretende-se alcançar os objetivos específicos a seguir:

- Caracterizar a morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão;
- Caracterizar a composição molecular das nanopartículas por espectroscopia de absorção no infravermelho;
- Avaliar a carga superficial e o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas a fim de avaliar a estabilidade coloidal;
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas em diferentes composições pelo método MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) em linhagem celular de fibroblastos murino (NIH 3T3);
- Avaliar a internalização das nanopartículas em linhagem celular de câncer colorretal murino (CT-26) avaliados por microscopia confocal.

5. METODOLOGIA

5.1. Síntese das nanopartículas

As nanopartículas esféricas de sílica foram obtidas por nanoemulsão água-óleo estabilizada com surfactante. Resumidamente, adaptando o método de Stöber, foram utilizados os seguintes reagentes: AoT (*Bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate*), ciclohexano, *tetraethylorthosilicate* (TEOS), hidróxido de amônio (1 mol/L), etanol absoluto, terras raras (érbio e itérbio) e água. Essa solução passou por um processo de hidrólise, que dura 24 horas e acontece sob agitação a 50°C, em seguida, ocorre a condensação catalisada por base, onde foi adicionado hidróxido de amônio (2 mol/L). A condensação ocorreu ao longo de 72 horas, período em que as nanopartículas

ficaram guardadas ao abrigo da luz. Após a condensação, as nanopartículas foram lavadas com acetona e deixadas na estufa a 50°C *overnight* para secagem.

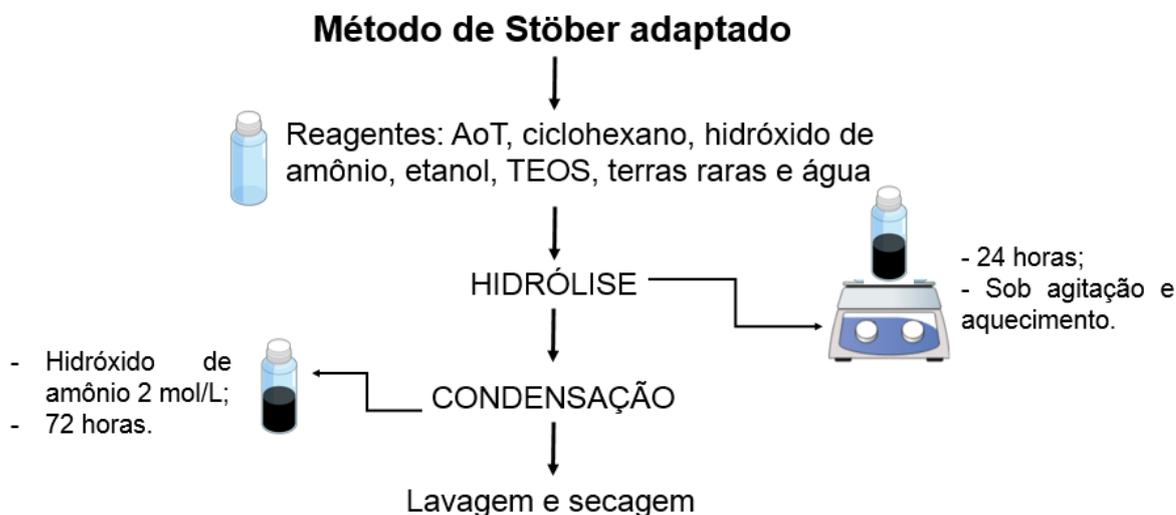


FIGURA 5 – Esquema do método de síntese das nanopartículas. **Fonte:** autor.

O recobrimento das nanopartículas foi realizado por meio de adsorção simples. Foi preparada uma solução com ftalocianina de zinco e *tetrahidrofurano* (THF), e separado alíquotas desta solução, nas quais foram adicionados *poly(vinylpyrrolidone)* (PVP) e ácido fólico, ou apenas o PVP. Nestas soluções foram adicionadas as nanopartículas, as quais ficaram sob agitação até a completa evaporação do solvente, onde então foram levadas a estufa a 50°C para secagem e posteriormente armazenadas ao abrigo da luz.

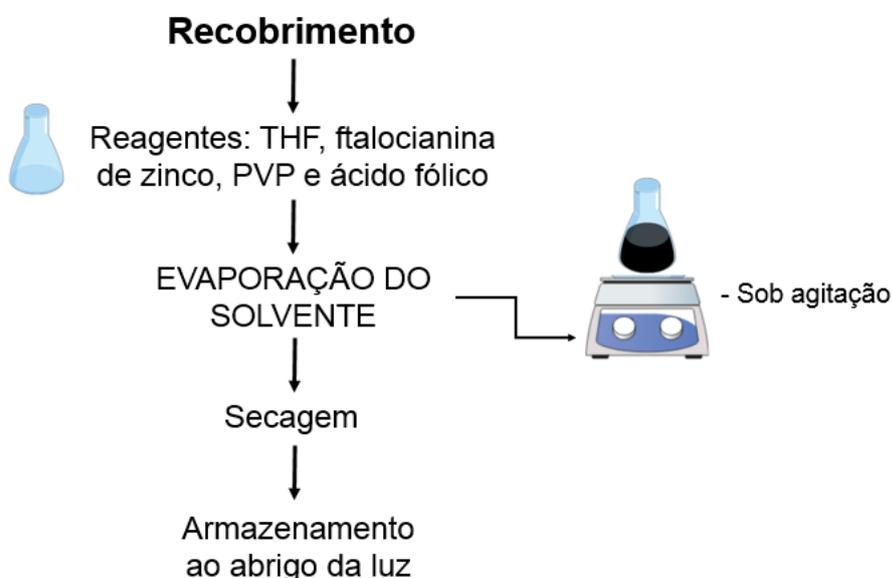


FIGURA 06 – Esquema do recobrimento das nanopartículas. **Fonte:** autor.

5.2. Ensaio de caracterização

As características morfológicas das nanopartículas sintetizadas foram avaliadas por meio do Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), sendo esta uma técnica eficiente para estudo de morfologia e tamanho de nanomateriais (DA COSTA, 2018).

As amostras das formulações das nanopartículas foram diluídas (1mg da amostra em 1mL de água deionizada) e vortexizadas por 5 minutos. Uma alíquota da amostra foi aplicada em telas de microscopia eletrônica de transmissão e após a evaporação do solvente a análise foi realizada no microscópio eletrônico JEOL (JEM-1011) da Universidade de Brasília.

Para caracterização da composição das nanopartículas, a fim de identificar as ligações formadas e as interações intermoleculares, foi avaliado o espectro vibracional na região do infravermelho (FTIR), o espectro foi avaliado no intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . As amostras foram dispersadas e pastilhadas em KBr na proporção de 1% (m/m) da amostra e analisadas no Espectrofotômetro FTIR da FCE/ Universidade de Brasília.

A estabilidade das amostras foi testada por meio do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta no Zetasizer (ZS90, Malvern – Universidade de Brasília). As medições foram realizadas em triplicata, onde as nanopartículas foram suspensas em solução aquosa a 0,5% (m/v) e vortexizadas por 1 minuto.

5.3. Ensaio biológico

Para este estudo, foram utilizados a linhagem celular de fibroblasto murino (NIH 3T3) e linhagem de câncer colorretal murino (CT-26). Estas linhagens foram cedidas pelo grupo de pesquisa do professor Luís Alexandre Muehlmann do Instituto de Biologia – UnB. As linhagens, depois de descongeladas, foram mantidas em garrafas de cultivo na incubadora a 37 °C, 80% de umidade e atmosfera de 5% CO_2 . Subculturas foram estabelecidas conforme necessidade de cada tipo celular. A realização das subculturas foram feitas assim que as células apresentavam monocamada com confluência de 80%, onde estas passavam por processo de dissociação enzimática com Tripsina-EDTA 0,25%. Assim que as células estivessem

desprendias, adicionou-se meio de cultivo na garrafa para inativar a enzima, esta solução foi centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas. Para uma nova garrafa eram transferidas 20% das células viáveis, as quais foram quantificadas usando 10 µL da suspensão de células e 90 µL do corante Azul de Tripán 0,4% em PBS (solução tampão fosfato). O corante utilizado não penetra em células com membranas intactas, sendo, assim, possível fazer a contagem das células viáveis aplicando 10 µL da suspensão em hemocitômetro de Neubauer.

Para os teste de viabilidade e de internalização, se fez necessário o plaqueamento das subculturas celulares. Para o plaqueamento, primeiro se suplementa o meio de cultivo utilizado, no caso o DMEM (modificação do meio *Eagle Dulbecco*), com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico, depois se faz a dissociação enzimática das células da garrafa, de modo semelhante a realização das subculturas, só que após a contagem do número de células, estas são passadas para placas de 96 ou 12 poços, conforme teste a ser realizado, sendo que para a placa de 96 poços colocou-se, em média, 1×10^4 células/poço, e na placa de 12 poços, 5×10^4 células/poço.

5.4. Ensaio de toxicidade

A toxicidade das formulações das nanopartículas de sílica foi realizada por avaliação colorimétrica do MTT (*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]*). Depois do plaqueamento da linhagem NIH 3T3 em placas de 96 poços, fez-se o tratamento com as nanopartículas de sílica em triplicata, em 2 concentrações (1 mg/mL; 0,5 mg/mL) por 24 horas.

O MTT interage com as desidrogenases da mitocôndria das células viáveis, onde o este é reduzido a formazan. O formazan, possui morfologia de cristal, cor púrpura e é hidrofóbico, características que permitem que a quantificação do mesmo seja feita por espectro de absorbância no comprimento de onda de 595 nm em leitor de placas acoplado a espectrofotômetro (RODRIGUES, 2014). Quanto maior a produção de formazan por poço, conseqüentemente, mais células viáveis se tem e menos tóxico é a formulação testada.

5.5. Ensaio de internalização

Para a verificação da internalização celular das nanopartículas de sílica funcionalizadas com ftalocianina de zinco, foi utilizada a linhagem celular de câncer colorretal murino (CT-26). As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 12 poços com lamínula de 20 mm de diâmetro ao fundo. As formulações das nanopartículas foram testadas na concentração de 0,125mg/mL, após o período de incubação de 15 minutos da células CT-26 com as nanopartículas, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS). Para a marcação do núcleo das células foi utilizado o corante DAPI (*4',6-diamidino-2-fenilindo*), depois de coradas por 15 min em temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS duas vezes e as lamínulas retiradas e colocadas em lâmina. As lâminas foram levadas para o microscópio confocal (SP5, Leica – Universidade de Brasília), onde foram utilizados os comprimentos de onda para excitação e emissão de 358 e 461nm para o corante DAPI e 405 e 633nm para a ftalocianina de zinco.

5.6. Análise de dados

A partir das absorvâncias (abs.) obtidas pelo método MTT foi realizado o cálculo de viabilidade celular (VC), conforme equação:

$$VC = (abs_{amostra} \times 100\%) \div abs_{controle}$$

Os valores obtidos, em porcentagem, foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 7* para geração dos gráficos.

Os gráficos resultantes do FTIR foram produzidos utilizando o programa *Origin Pro 8*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização das Nanopartículas

A avaliação da estabilidade coloidal das nanopartículas de sílica foi realizado por meio do ensaio de espalhamento dinâmico de luz, onde se obteve os dados da **Tabela I** que apresenta os valores de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das formulações de nanopartículas.

TABELA I – Valor médio do potencial zeta (Zt) e do diâmetro hidrodinâmico (DH).

Nanopartículas	DH (nm)	Zt (-mV)
Nano 1	56	- 33,0
Nano 2	65	- 31,4
Nano 3	63	- 27,9

Nano 1: nanopartículas de sílica sem recobrimento e sem ftalocianina de zinco. Nano 2: nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP e folato. Nano 3: nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP.

Um nanocarreador é avaliado por suas características, tais como tamanho e carga de superfície, estes devem possuir tamanho entre 10 e 100 nm e carga superficial neutra ou aniônica, proporcionando assim um escape da filtração e eliminação renal e metabolização no fígado, contribuindo assim para um maior tempo de circulação das nanopartículas (GULLOTTI; YEO, 2009; IYER et al., 2006), visto que as nanopartículas avaliadas apresentaram tamanho entre o intervalo de 10 a 100 nm e carga de superfície aniônica, estas se encaixam nas características acima citadas de bons nanocarreadores.

A morfologia das nanopartículas de sílica em suas diferentes formulações foram avaliadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão, todas apresentaram-se esféricas, e com aspecto poroso, como demonstra a **Figura 07**.

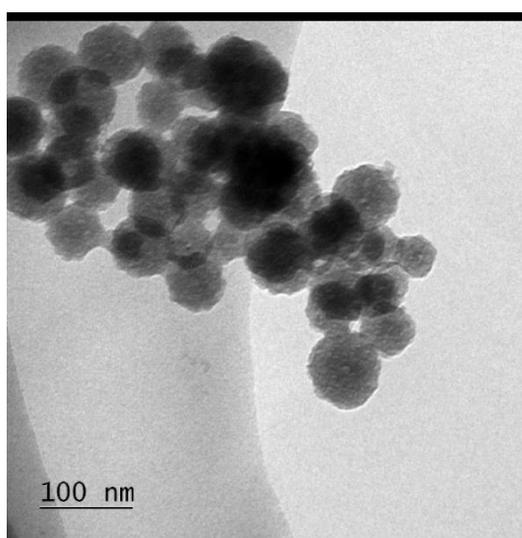


FIGURA 07 – Nanopartículas de sílica sem recobrimento visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A composição das nanopartículas foram avaliadas por meio do espectro vibracional na região do infravermelho.

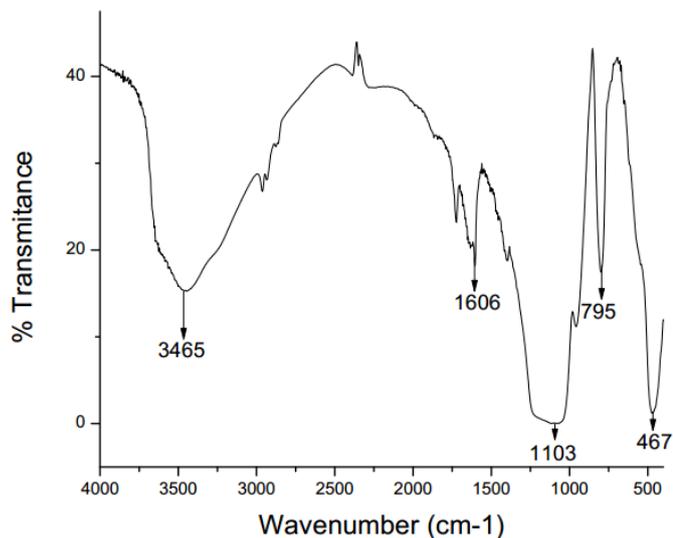


FIGURA 08 – Espectro do FTIR das nanopartículas de sílica sem recobrimento.

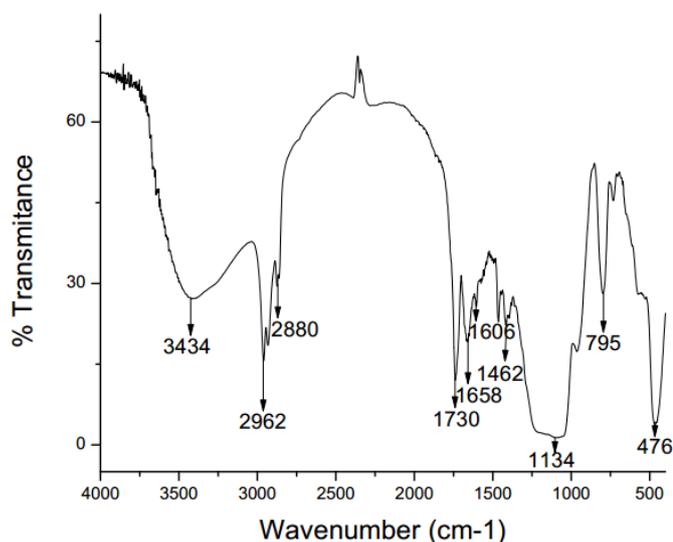


FIGURA 09 – Espectro do FTIR das nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina de zinco e recobertas com PVP e folato.

Na **Figura 09** as bandas 1658 e 1606 cm⁻¹, que representam respectivamente as ligações C=O e N-H, podem ser atribuídas ao ácido fólico (STEVANOVIC et al., 2008). O PVP, assim como o ácido fólico apresenta banda em, aproximadamente, 1659 cm⁻¹, além das bandas em 1292 e 1443 cm⁻¹, no espectro apresentado é possível

observar um pico em 1462 cm^{-1} , que pode ser atribuído a ligação C-N-C, presente no PVP (ANASUYA et al., 2014).

Nos dois espectro do apresentados na **Figura 08** e **Figura 09** é possível identificar a presença do TEOS, que possui picos entre 3500 a 3000 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 793 cm^{-1} e 473 cm^{-1} , que representam, respectivamente, estiramento O-H, deformação C-H, deformação Si-O₄ e deformação O-C-C (RUBIO et al., 1998).

TABELA II – Identificação espectrofotométrica de grupos funcionais.

Número de Onda (cm-1)	Atribuição
3434	Estiramento <i>O – H</i>
2880	Estiramento <i>N – H</i>
1658	<i>C = O</i>
1606	<i>N – H</i>
1462	<i>C – N – C</i>
795	Deformação <i>Si – O₄</i>
473	Deformação <i>O – C – C</i>

6.2. Biocompatibilidade

As nanopartículas de sílica, sem recobrimento, foram testadas nas concentrações de 1mg/mL e $0,5\text{mg/mL}$ e mantiveram a média de viabilidade celular, respectivamente, de $77,34 \pm 2,62\%$ e $85,14 \pm 3,60\%$ na linhagem de fibroblastos murino (**Figura 10**).

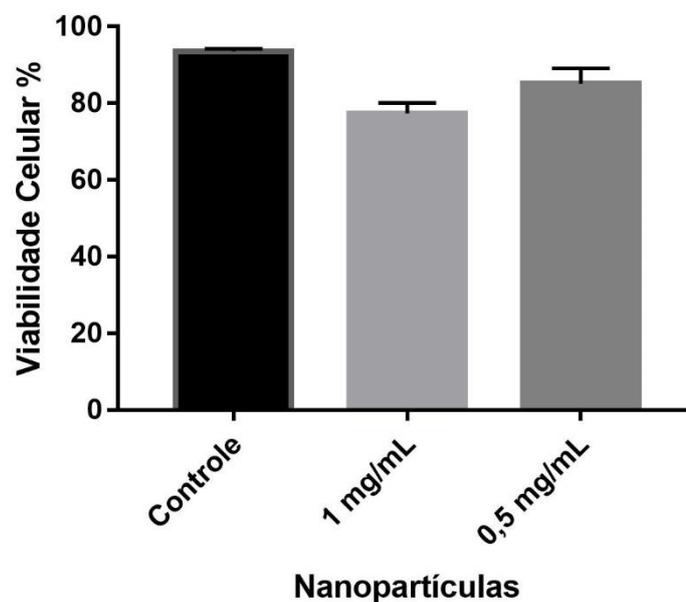


FIGURA 10 – Ensaio de toxicidade de Nanopartículas de sílica sem recobrimento, em células da linhagem NIH 3T3.

As nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina de zinco e recobertas com PVP a 10%, obtiveram os seguintes resultados de viabilidade celular $76,10 \pm 3,47\%$ e $60,28 \pm 5,39\%$, nas concentrações de 1mg/mL e 0,5mg/mL (**Figura 11**).

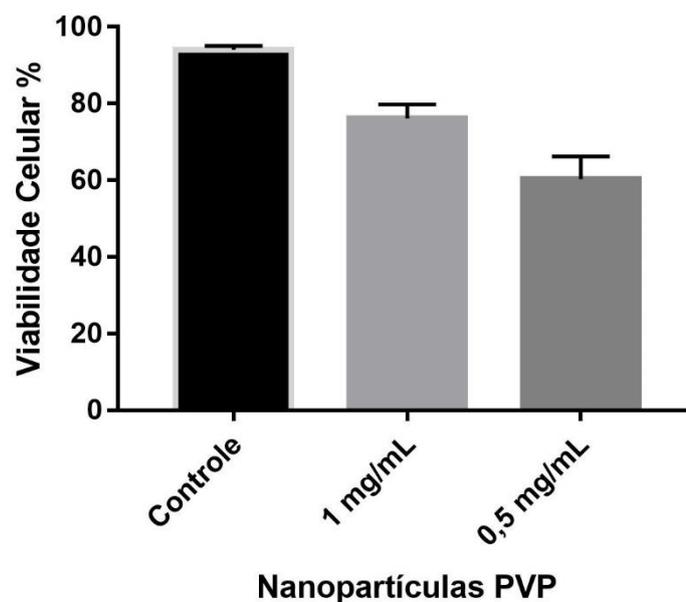


FIGURA 11 – Ensaio de toxicidade de Nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP, em células da linhagem NIH 3T3.

As nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina de zinco e recobertas com PVP a 10% e folato a 5%, obtiveram os seguintes resultados de viabilidade celular $67,08 \pm 4,04\%$ e $57,69 \pm 1,88\%$, nas concentrações de 1mg/mL e 0,5mg/mL em células da linhagem NIH 3T3 (**Figura 12**).

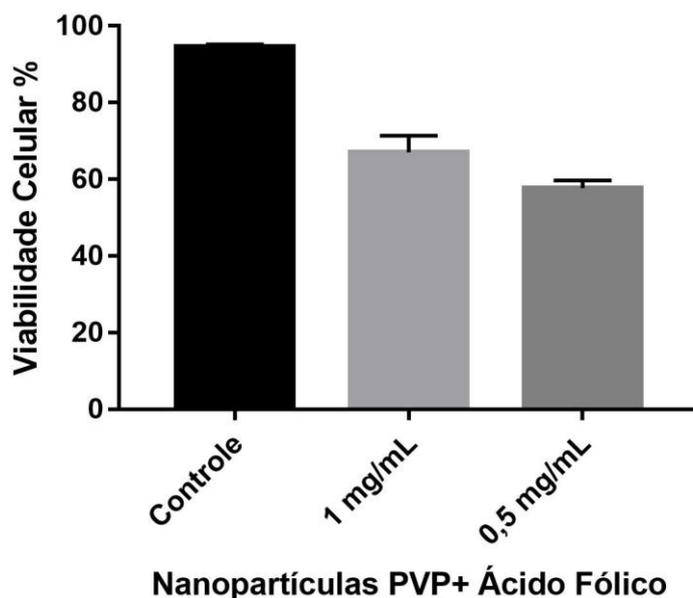


FIGURA 12 – Ensaio de toxicidade de Nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP e ácido fólico, em células da linhagem NIH 3T3.

A avaliação colorimétrica do MTT (*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]*) é utilizada em diversos trabalhos como parâmetro de biocompatibilidade, onde se verifica se o material a ser testado de alguma forma interfere com o bom funcionamento celular.

Como pode se verificar através dos gráficos apresentados, houve variação entre os resultados das nanopartículas de sílica sem recobrimento e as demais recobertas com PVP e PVP mais ácido fólico. No entanto todas se demonstraram biocompatíveis, o que já era esperado, dado que tanto a sílica, quanto o ácido fólico são materiais conhecidos por sua biocompatibilidade. Alguns fatores podem influenciar os resultados, como a concentração das nanopartículas, o meio de crescimento utilizado para as células, entre outros.

6.3. Internalização

A linhagem celular CT-26 foi exposta por 15 minutos as formulações de nanopartículas sem recobrimento, nanopartículas dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP, e as nanopartículas dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP a 10% e folato 5%, todas na concentração de 0,125mg/mL. Apenas a formulação dopada com ftalocianina e recoberta com PVP e folato foram visualizadas no citoplasma das células CT-26 (**Figura 13**). Para as demais formulações testadas não foi possível visualizar as células por microscopia confocal.



FIGURA 13 – Visualização por microscopia confocal da internalização das nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina e recobertas com PVP e folato pelas células da linhagem CT-26. A: Sobreposição das imagens B e C, onde em azul é o núcleo das células e em vermelho as nanopartículas; B: Em destaque o núcleo das células coradas pelo corante DAPI; C: Em destaque as nanopartículas de sílica dopadas com ftalocianina no citoplasma das células.

7. CONCLUSÃO

Os parâmetros de síntese utilizados nas formulações das nanopartículas resultaram no objetivo que se pretendia alcançar, que era uma nanopartícula esférica que apresentasse características desejáveis a um bom nanocarreador, além de se obter uma formulação de nanopartículas recobertas com ácido fólico, de modo que este possa facilitar a internalização das nanopartículas de sílica nas células alvo.

Os ensaios de biocompatibilidade demonstraram que o recobrimento das nanopartículas levaram a uma diminuição da viabilidade celular em comparação as nanopartículas não recobertas.

Por fim, apenas as nanopartículas recobertas com ácido fólico foram internalizadas pelas células da linhagem de colorretal murinho, demonstrando assim que a presença do ácido fólico, como esperado, foi um facilitador dessa internalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASUYA, K. V.; VEERAIHAH, M. K.; HEMALATHA, P.; MANJU, M. Synthesis and Characterisation of Poly (Vinylpyrrolidone) – Nickel (II) Complexes. *Journal of Applied Chemistry*, v. 7, n. 8, p. 61-66, 2014.

BAEZA, Alejandro; COLILLA, Montserrat; VALLET-REGÍ, María. Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery. *Expert Opinion On Drug Delivery*, [s.l.], v. 12, n. 2, p.319-337, 25 nov. 2014. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2014.953051>.

BAZAK, Remon et al. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology*, [s.l.], v. 141, n. 5, p.769-784, 9 jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-014-1767-3>.

BHARTI, Charu et al. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *International Journal Of Pharmaceutical Investigation*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.124-133, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2230-973x.160844>.

COLILLA, Montserrat; BAEZA, Alejandro; VALLET-REGÍ, María. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Controlled Release Applications. *The Sol-gel Handbook*, [s.l.], p.1309-1344, 21 ago. 2015. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527670819.ch42>.

CROISSANT, Jonas G. et al. Two-Photon-Excited Silica and Organosilica Nanoparticles for Spatiotemporal Cancer Treatment. *Advanced Healthcare Materials*, [s.l.], v. 7, n. 7, p.1-22, 18 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201701248>.

DA COSTA, Rodrigo Luiz. Estudo das Propriedades de Superfícies de Nanopartículas Magnéticas de Magnetita Recobertas com Alcoóxisilanos. 2018. 42 f. Monografia (Graduação – Farmácia), Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

DE OLIVEIRA, Luciane França et al. Functionalized silica nanoparticles as an alternative platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs. *Langmuir*, v. 32, n. 13, p. 3217-3225, 2016.

FERRAZ, MILENA SALES. Preparação e Caracterização de nanocápsulas furtivas e sítio-específicas para o tratamento do câncer. 2013. 107 f. Dissertação (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

GULLOTTI, E., YEO, Y. Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, v.6 , p.1041–1051, 2009

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

IYER, A.K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*, v.11, p.812–818, 2006.

LU, Jie et al. In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, [s.l.], v. 8, n. 2, p.212-220, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.002>.

MUTTI, Alessandra Mara Garbosa. Estudo de nanocompósitos luminescentes baseados em complexos de Eu(III) e Ir(III) ancorados à nanopartículas de sílica por bases de Schiff. 2015. 185 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista “júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

RODRIGUES, Mosar Corrêa. Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro. 2014. 138 f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

RÓZ, Alessandra Luzia da et al. *Grandes Áreas da Nanociência: Princípios e Aplicações*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 304 p.

RUBIO, F; RUBIO, J; OTEO, J. L. A FT-IR Study of the Hydrolysis of Tetraethylorthosilicate (TEOS). **Spectroscopy Letters**, v. 31, n. 1, p. 199-219, 1998.

SILVA FILHO, Pedro Martins da. Síntese de nanopartículas de sílica carregadas positivamente e estudo de adsorção de fármacos aniônicos. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SONG, Nan; YANG, Ying-wei. Molecular and supramolecular switches on mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, [s.l.], v. 44, n. 11, p.3474-3504, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5cs00243e>.

SOUSA FILHO, Paulo C. de et al. Synthesis and Luminescent Properties of REVO₄-REPO₄ (RE = Y, Eu, Gd, Er, Tm, or Yb) Heteronanostructures: A Promising Class of Phosphors for Excitation from NIR to VUV. *The Journal Of Physical Chemistry C*, [s.l.], v. 119, n. 42, p.24062-24074, 8 out. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08249>.

STEVANOVIC, M., RADULOVIC, A., JORDOVIC, B., USKOKOVIC, D. Poly (DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid. *J. Biomed. Nanotech*, v. 4, p. 1–10, 2008.

WANG, Feng et al. Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping. **Nature**, [s.l.], v. 463, n. 7284, p.1061-1065, 2010.

WONG, Roy C. H. et al. Encapsulating pH-Responsive Doxorubicin-Phthalocyanine Conjugates in Mesoporous Silica Nanoparticles for Combined Photodynamic Therapy and Controlled Chemotherapy. *Chemistry - A European Journal*, [s.l.], v. 23, n. 65, p.16505-16515, 19 set. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201703188>.

WONG, Roy C. H. et al. PH-Responsive Dimeric Zinc(II) Phthalocyanine in Mesoporous Silica Nanoparticles as an Activatable Nanophotosensitizing System for Photodynamic Therapy. *Acs Applied Materials & Interfaces*, [s.l.], v. 9, n. 28, p.23487-23496, 6 jul. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.7b06353>.

ZHANG, Quan et al. Biocompatible, Uniform, and Redispersible Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer-Targeted Drug Delivery In Vivo. *Advanced Functional Materials*, [s.l.], v. 24, n. 17, p.2450-2461, 21 dez. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201302988>.