

Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Biomedicina
Translacional – BIOTRANS

Isabel Cristina Gomes Santos

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA PROLIFERAÇÃO E
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA E CÂNCER DE
PRÓSTATA

Duque de Caxias – RJ

2022

Isabel Cristina Gomes Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA PROLIFERAÇÃO E
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA E CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia e Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Celso Barbosa de Sant'Anna Filho
Orientador

Duque de Caxias – RJ

2022

Isabel Cristina Gomes Santos

**EVALUATION OF THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES
TREATMENT ON THE PROLIFERATION AND VIABILITY OF
GLIOBLASTOM AND PROSTATE CANCER CELLS**

Master thesis submitted as partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master in Biomedical of Science in the Postgraduate Program in Translational Biomedicine at the University of Grande Rio, National Institute of Metrology, Quality and Technology and West Zone State University Center.

Celso Barbosa de Sant'Anna Filho

Advisor

Duque de Caxias – RJ

2022

ESSA FICHA SERÁ ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA UNIGRANRIO,
INMETRO E UEZO APÓS A DEFESA. ATÉ A DEFESA, ESTA FICHA
FICARÁ COMO ESTÁ APENAS COMO REFERÊNCIA E RESERVA DE
ESPAÇO NO TEXTO DA MONOGRAFIA.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SANTOS, Isabel Cristina Gomes. **Avaliação do efeito do tratamento de nanopartículas de prata na proliferação e viabilidade de células tumorais e não tumorais**. 2022. 86f. Dissertação de Mestrado em Biomedicina Translacional – Universidade do Grande Rio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia e Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Duque de Caxias, RJ, 2022.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Isabel Cristina Gomes Santos.

TÍTULO DA MONOGRAFIA: Avaliação do efeito do tratamento de nanopartículas de prata na proliferação e viabilidade de células glioblastoma e câncer de próstata.

TIPO DE MONOGRAFIA: Dissertação de Mestrado em Biomedicina Translacional / 2022.

É concedida a Universidade do Grande Rio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia e Centro Universitário Estadual da Zona Oeste a permissão para reproduzir e emprestar cópias desta monografia somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação.

Isabel Cristina Gomes Santos

Av. Nossa Senhora das Graças, 50 – Xerém – Duque de Caxias – RJ
Laboratório de Microscopia Aplicada a Ciências da Vida– Prédio 47

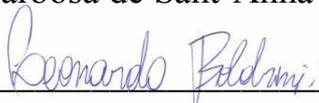
Isabel Cristina Gomes Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA PROLIFERAÇÃO E
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA E CÂNCER DE
PRÓSTATA**

A presente Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia e Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, foi aprovada pela seguinte Banca Examinadora:



Doutor Celso Barbosa de Sant'Anna Filho– Inmetro



Doutor Leonardo da Cunha Boldrini Pereira – Inmetro

Presidente da Banca Examinadora

BANCA MESTRADO
ISABEL CRISTINA GOMES SANTOS
09/05/2022

Luis Mauricio T. R. Lima
Prof. Titular – UFRJ
SIAPE 2222962

Doutor Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima – UFRJ



Doutor Sergio Henrique Seabra – UENF

Duque de Caxias, 09 de maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

A Deus que em todos os momentos esteve comigo e permitiu que eu chegasse até aqui.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe que sempre me apoiou e fez todo o possível para me ajudar a seguir em busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador Celso Sant'Anna, agradeço pela paciência, pelo apoio que recebi nesses anos, por toda dedicação em buscar recursos para nosso projeto, ajudando a superar cada obstáculo que apareceu pelo caminho.

Aos meus colegas de grupo, Renata N., Thais, Verônica, Chayenne, Nathalia, Mateus, Yuri e principalmente a Michelle por ter estado comigo desde o primeiro dia, sempre me ajudando e me ensinando as técnicas utilizadas nesse trabalho, por toda a boa vontade em ajudar e por ter dividido comigo a bancada diversas vezes. Quero agradecer a minha amiga Natália Yoshihara que me ajudava a cada minuto com a sua alegria, por escutar meus desabaços e traçar estratégias comigo, sua contribuição foi fundamental não só para meu trabalho, mas para minha vida.

A todos do prédio 47, pelas comemorações e por tornar meus dias melhores e mais leves, em especial ao Lucas e Paula por estarem sempre dispostos a ajudar muito no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim muito obrigado a todos que conviveram comigo nesses anos, através de cada um obtive muitos aprendizados que serão levados para minha vida, tanto profissional quanto pessoal.

EPÍGRAFE

“Imagination is more important than knowledge. Imagination is the language of the soul. Pay attention to your imagination and you will discover all you need to be fulfilled”

(ALBERT EINSTEIN).

RESUMO

O câncer se enquadra nas doenças que são as principais responsáveis pelo adoecimento e óbito da população no mundo. Atualmente, os tratamentos mais utilizados são a remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, além dos efeitos adversos, muitos tipos de tumores são resistentes à radioterapia e aos agentes quimioterápicos. Neste contexto, tratamentos antitumorais mais eficientes vêm sendo buscados. Dentre as novas estratégias terapêuticas, a utilização de nanopartículas de prata (AgNPs), tem se destacado devido a seus múltiplos mecanismos de ação e eficácia já demonstrada *in vitro* e *in vivo*. No entanto, as AgNPs ainda não tiveram seus efeitos suficientemente avaliados em células de mamíferos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das AgNPs sob a proliferação e a viabilidade celular de células derivadas de linhagens celulares de câncer e células saudáveis. Para avaliar o potencial antitumoral das nanopartículas foram utilizadas como modelo as linhagens tumorais U87 (glioblastoma) e DU-145 (câncer de próstata) que foram tratadas com concentrações entre 1,56 a 100 µg/mL de AgNPs. A avaliação de seletividade foi realizada usando como modelo as células não tumorais HFF-1 (fibroblasto). A avaliação do efeito antiproliferativo, viabilidade, área nuclear, conteúdo de DNA, produção de ROS foram realizados através da análise alto conteúdo (HCA). A viabilidade foi avaliada também por ensaio de MTT. Nos ensaios de proliferação, as linhagens tumorais U87 e DU-145 demonstram que o tratamento foi mais eficiente inibindo 89,30% e 79,74%, respectivamente, o crescimento dessas células quando tratadas com 100 µg/mL. As taxas de crescimento foram reduzidas e o tempo de duplicação foi aumentado nessas células após o tratamento com as AgNPs. As linhagens tumorais sofreram reduções na área do núcleo bem como no conteúdo de DNA quando tratadas com AgNPs, indicando danos ao DNA. A linhagem não tumoral HFF-1 não demonstrou alterações significativas no tratamento com AgNPs em relação a proliferação, taxa de crescimento, tempo de duplicação e área nuclear. Nas análises da viabilidade celular foram observadas após o tratamento com AgNPs reduções de 79% e 63% nos ensaios de MTT e 30% e 52,2% nas análises por HCA nas linhagens tumorais U87 e DU-145, respectivamente. A linhagem HFF-1 se mostrou menos sensível, apresentando reduções de viabilidade apenas nas concentrações maiores de 50 e 100 µg/mL, menores em relação as das células tumorais. As células tumorais (U87 e DU-145) apresentaram IC₅₀ consideravelmente menor em relação as células não tumorais (HFF-1), mostrando que o tratamento foi seletivo para essas células. O aumento na produção de ROS não foi observado em nenhuma das células das analisadas. Os resultados apontam que as AgNPs podem ser candidatos promissores no combate a determinados tipos de cânceres.

Palavras-chave: antitumoral; nanopartículas de prata; proliferação; viabilidade.

ABSTRACT

Cancer is part of the diseases that are the main responsible for the illness and death of the population in the world. Currently, the most used treatments are surgical removal, radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy. However, in addition to adverse effects, many types of tumors are resistant to radiotherapy and chemotherapeutic agents. In this context, more efficient antitumor treatments are being sought. Among the new therapeutic strategies, the use of silver nanoparticles (AgNPs) has been highlighted due to its multiple mechanisms of action and efficacy already demonstrated *in vitro* and *in vivo*. Due to being recent, AgNPs have not yet had their effects sufficiently evaluated in mammalian cells. The objective of this work was to evaluate the effect of AgNPs on the proliferation and cell viability of cells derived from cancer cell lines and healthy cells. To evaluate the antitumor potential of the nanoparticles, the tumor lines U87 (glioblastoma) and DU-145 (prostate cancer) were used as a model, which were treated with concentrations between 1.56 to 100 $\mu\text{g/mL}$ of AgNPs. The selectivity evaluation was performed using the HFF-1 non-tumor cells (fibroblast) as a model. The evaluation of the antiproliferative effect, viability, nuclear area, DNA content, ROS production were performed using high content analysis (HCA). Viability was also assessed by MTT assay. In the proliferation assays, the tumor lines U87 and DU-145 demonstrate that the treatment was more efficient, inhibiting 89.30% and 79.74%, respectively, the growth of these cells, when treated with 100 $\mu\text{g/mL}$. Growth rates were reduced and doubling time was increased in these cells after treatment with AgNPs. Tumor lines suffered reductions in nucleus area as well as DNA content when treated with AgNPs, indicating DNA damage. The non-tumor HFF-1 strain did not show significant changes in the treatment with AgNPs in relation to proliferation, growth rate, doubling time and nuclear area. In the analysis of cell viability, reductions of 79% and 63% in the MTT assays and 30% and 52.2% in the analyzes by HCA in the U87 and DU-145 tumor lines were observed after treatment with AgNPs, respectively. The HFF-1 strain did not show viability reductions only at concentrations greater than 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, and were lower than those of tumor cells. Tumor cells (U87 and DU-145) showed considerably lower IC₅₀ compared to non-tumor cells (HFF-1), showing that the treatment was selective for these cells. The increase in ROS production was not observed in any of the analyzed cells. The results indicate that AgNPs may be promising candidates in the fight against certain types of cancers.

Keywords: antitumor; silver nanoparticles; proliferation; viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da metástase da mama para o osso	19
Figura 2 – Visualização e manipulação de átomos por microscopia	22
Figura 3 – Nanotecnologia e suas aplicações	23
Figura 4 – Diferentes fatores que podem influenciar nas propriedades físico-químicas únicas das NPs	25
Figura 5 – Taça de Lycurgus	27
Figura 6 – Desenho esquemático das abordagens <i>Top-down</i> e <i>Bottom-up</i> para a síntese de nanomateriais	28
Figura 7 – Mecanismos de citotoxicidade gerados pelas AgNPs na célula	34
Figura 8 – Curvas de crescimento com concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 de células tumorais (U87 e DU-145) e não tumorais (HFF-1).....	43
Figura 9 – Imagens representativas das curvas de crescimento das linhagens tumorais e não tumorais	46
Figura 10 – Imagens representativas do ensaio de proliferação humanas tumorais (U87 e DU-145) e não tumorais (HFF-1)	49
Figura 11 – Ensaio de proliferação de células humanas tumorais e não tumorais após tratamento com AgNPs	50
Figura 12 – Taxa de crescimento das linhagens HFF-1, U87 e DU-145	52
Figura 13 – Área e intensidade de fluorescência nuclear das linhagens HFF-1, U87 e DU-145	56
Figura 14 – Ensaio de viabilidade por MTT de células humanas tumorais e não tumorais ...	58
Figura 15 – IC_{50} calculado de acordo com o ensaio de MTT nas linhagens tumorais e não tumorais	60
Figura 16 – Ensaio de viabilidade por HCA de células humanas tumorais e não tumorais ...	62

Figura 17 – Imagens representativas da análise da produção de ROS em linhagens celulares tumorais e não tumorais 63

Figura 18 – Análise da presença de ROS nas linhagens tumorais e não tumorais 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de inibição das linhagens HFF-1, U87 e DU-145 diante do tratamento com diferentes concentrações de AgNPs em diferentes tempos	48
Tabela 2 – Taxa de crescimento (<i>f</i>) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com AgNPs	53
Tabela 3 – Tempo de duplicação (TDDP) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com AgNPs em horas	54
Tabela 4 – IC ₅₀ (µg/mL) calculado de acordo com cada tratamento em HFF-1, U87 e DU-145	54
Tabela 5 – IC ₅₀ e Índice de Seletividade (IS) calculado de acordo com a viabilidade realizada através da análise de MTT em HFF-1, U87 e DU-145 após o tratamento com AgNPs	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag⁺: íon prata

AgNPs: Nanopartículas de Prata

AOT: Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio

AuNPs: Nanopartículas de Ouro

BSA: Albumina do Soro Bovino

BSS: do inglês *Brust-Schiffirin synthesis*

CTAB: Brometo de Cetrimônio

DEMEM – Do inglês, Dulbeccos modified eagle medium

DHE: Dihidroetídio

DNA: do inglês, *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade Óptica

DRX: Difração de Raios X

EDS: Energia Dispersiva de Raios X

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HCA: do inglês, *High-content analysis*, Análise de Alto Conteúdo

hNPCs: Células precursoras neurais embrionárias humanas

IBM: do inglês, *International Business Machiness*

IC50: do inglês, *inibitory concentration of 50%*, concentração inibitória de 50%

ILGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MIC: Concentração inibitória mínima

MSCs: Células tronco mesenquimais

NaBH₄: boro-hidreto de sódio

NIH: do inglês, *National Institutes of Health*, Institutos Nacional de Saúde

NPs: Nanopartículas

ND - Não determinado

NPMs: Nanopartículas Metálicas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PLL: Poli-L-Lisina

PVP: Polivinilpirrolidona

ROS: Do inglês, *Reactive oxygen species*, Espécies reativas de oxigênio

RPSL: Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

SFB – Soro fetal bovino

TSC: citrato trissódico

UA: Unidade Arbitrária

WHO - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Câncer.....	17
1.1.1 Tratamento	20
1.2 Nanotecnologia	21
1.2.1 Nanobiotecnologia	24
1.3 Nanopartículas	24
1.3.1 Nanopartículas não-metálicas	26
1.3.2 Nanopartículas metálicas	26
1.3.3 Síntese de nanopartículas.....	28
1.4 Nanopartículas de Prata.....	30
1.5 Aplicações biomédicas das AgNPs.....	31
1.6 Mecanismo de ação das AgNPS	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Síntese química das AgNPs	37
4.2 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	37
4.3 Curva de crescimento	38
4.4 Avaliação da proliferação celular	38
4.5 Determinação da taxa de crescimento e do tempo de duplicação da população celular	39
4.6 Determinação do IC50 e Índice de seletividade (IS)	39
4.7 Quantificação do conteúdo de DNA e área dos núcleos celulares.....	40
4.8 Avaliação da viabilidade celular por MTT.....	40
4.9 Avaliação da viabilidade celular por HCA.....	40
4.10 Avaliação da produção de ROS	41
4.11 Análises estatísticas.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1 Curva de crescimento	42
5.2 Proliferação celular	47

5.3 Taxa de crescimento e tempo de duplicação	51
5.4 Eficácia dos tratamentos com AgNPs a partir da determinação do IC ₅₀	54
5.5 Quantificação do conteúdo de DNA e área dos núcleos celulares.....	55
5.6 Viabilidade celular por MTT	57
5.7 IC ₅₀ e índice de seletividade	59
5.8 Viabilidade celular por HCA	61
5.9 Produção de ROS	63
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é atualmente é umas das principais causas de mortes no mundo (WHO, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer, também chamado de tumor maligno ou neoplasia, é um nome genérico dado a grande grupo de doenças que podem afetar quaisquer diferentes partes do corpo. Mais de 100 tipos de neoplasias fazem parte deste conjunto e maioria é classificada por onde se originaram (NIH, 2020). Por exemplo, carcinomas são cânceres derivados de células epiteliais, sarcomas são cânceres derivados de células musculares ou de tecidos conectivos, existem ainda outros tipos de câncer que não se enquadram nestas duas categorias, como os tumores do tecido nervoso e as leucemias e linfomas, que são tumores derivados de células hematopoiéticas. Existem ainda diversas subdivisões em cada classificação, por exemplo um adenocarcinoma é um tumor maligno originado no tecido epitelial, especificamente em uma glândula (ALBERTS *et al.*, 2017).

O câncer é caracterizado pela presença uma célula ou mais células que apresentam crescimento descontrolado e em muitos casos desenvolvem capacidade para invadir tecidos e realizar metástase (NAZEEMA & SUGANNYA, 2014). As células humanas, normalmente, crescem e se dividem para a formar novas células de acordo com a necessidade do organismo. Quando as células envelhecem ou estão danificadas, as células morrem e novas ocupam o lugar, havendo uma constante renovação celular. No entanto, quando esse processo ordenado falha, as células crescem e se proliferam descontroladamente, tornam-se cada vez mais anormais. As células velhas ou danificadas sobrevivem quando deveriam morrer, ao mesmo tempo que novas células são formadas quando não são necessárias. Essas células em excesso podem perturbar as relações celulares, resultando na disfunção de genes vitais. Além de se dividirem ininterruptamente dando origem a tumores, que podem ser tanto benignos quanto malignos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2020).

Os tumores formados podem ser considerados benignos, caso não possuam a capacidade de migrar por via sanguínea ou linfática para tecidos das proximidades (metástase) formando tumores secundários. Com crescimento de forma organizada, geralmente lento e apresentam limites bem nítidos. Nesse caso, pode haver a remissão completa pela destruição ou remoção cirúrgica da massa tumoral. Porém, apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes. Os tumores considerados malignos, são

chamados câncer, pois possuem a capacidade de invadir tecidos adjacentes formando metástase (HAUSMAN, 2019). A metástase é um processo que envolve um subgrupo de células cancerosas do tumor primário que adquirem a capacidade de migrar, entrar na corrente sanguínea, sobreviver à vigilância do sistema imunológico e finalmente se espalhar colonizando um local distante no corpo, formando tumores secundários em tecidos vizinhos e distantes do local em que a patologia se originou (Figura 1) (ALBERTS *et al.*, 2017; GUERRIERI *et al.*, 2020). A metástase está relacionada a 90% de mortes por câncer (CHATTERJEE *et al.*, 2018). Essa invasividade é uma característica essencial das células tumorais, uma vez que a colônia é estabelecida, as células metastáticas podem entrar em um estado de dormência, evitando os controles do sistema imunológico para serem reativadas posteriormente (GUERRIERI *et al.*, 2020). Existem ainda, alguns tipos de câncer como leucemia, que não formam tumores. Eles crescem nas células sanguíneas ou em outras células do corpo (INCA, 2020; NIH, 2020).

Sendo assim, a pesquisa do câncer ao longo do tempo foi marcada por avanços, os quais permitiram entender como as células tumorais desenvolvem tal autonomia. Assim sendo, estabeleceu-se que o câncer está envolvido em mudanças que afetam o genoma celular, produzindo proteínas que alteram o equilíbrio entre a divisão e quiescência, acarretando a divisão contínua destas células (HEJMADI, 2010; LIU *et al.*, 2019). A transformação de uma célula normal em outra com características neoplásicas, consiste em um processo dotado de diversas etapas conhecido como carcinogênese (BOYLE & LEVIN, 2018).

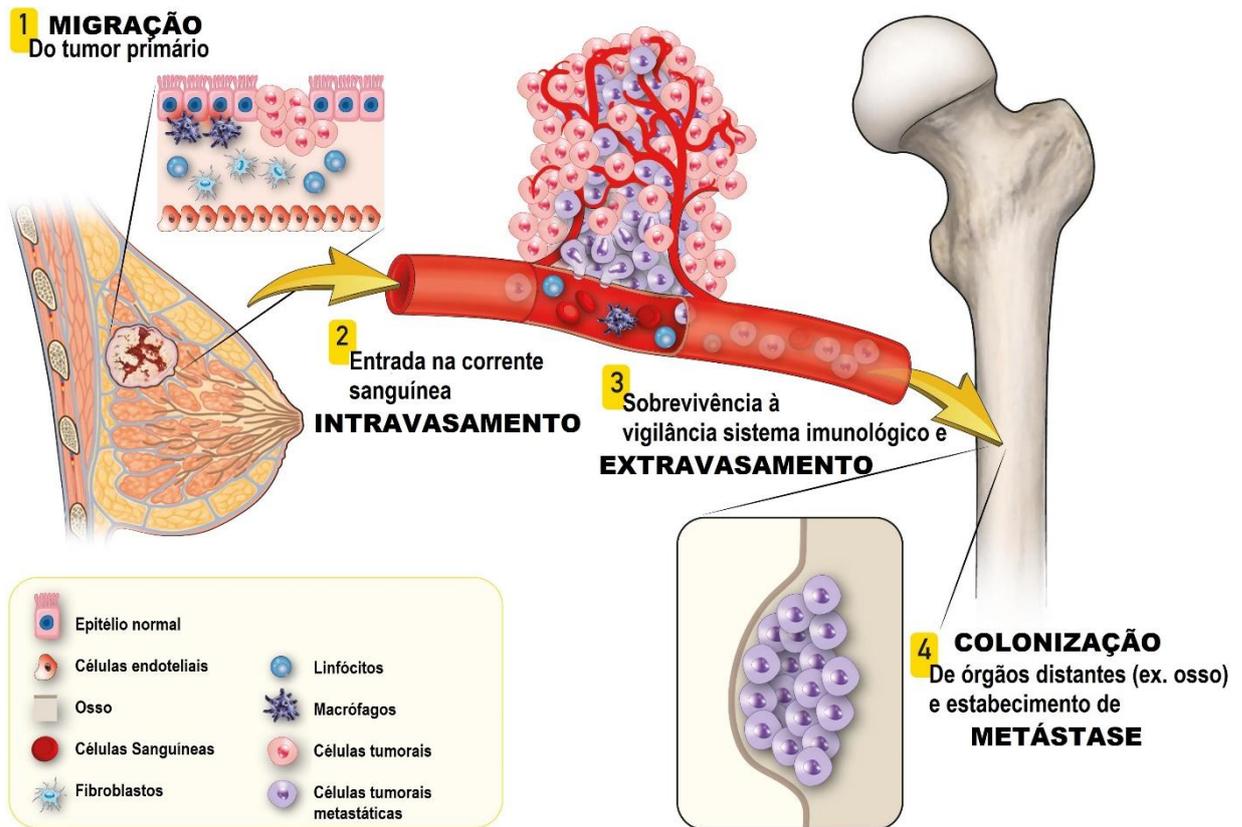


Figura 1. Representação esquemática da metástase da mama para o osso. Um subgrupo de células cancerosas do tumor primário (por exemplo, câncer de mama) adquire a capacidade de migrar (1), entrar na corrente sanguínea (intravasamento - 2), sobreviver à vigilância do sistema imunológico e sair da corrente sanguínea (extravasamento - 3) e finalmente espalhar colonizando um local vizinho ou distante do local de origem do tumor primário (por exemplo, osso - 4) (Adaptado de GUERRIERI *et al.*, 2020).

As causas para o câncer são diversas, sendo externas ou internas ao organismo, porém ambas estão inter-relacionadas. As causas externas são aquelas relacionadas ao meio ambiente e ao estilo de vida, hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural, que são evitáveis. Como por exemplo, uma alimentação inadequada, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, tipo de ocupação, exposição à radiação e a agentes químicos. Já causas internas são, em grande parte, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas, herança genética, mutações, hormônios e sistema imunológico comprometido, consideradas condições não evitáveis (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que tenha sido responsável por 10 milhões de mortes em 2020. A nível global, um homem em cada cinco e uma mulher em cada seis no mundo desenvolverá câncer durante a sua vida, enquanto um em cada oito homens e uma em cada 11 mulheres morrerão desta doença (WHO, 2021). No

Brasil, os cânceres que mais acometem as mulheres são os de mama, pulmão, colorretal, colo do útero e glândula tireoide. Nos homens, os mais comuns são os de próstata, pulmão, colorretal, estômago e cavidade oral. O câncer de pulmão, é o mais diagnosticado em ambos os sexos e é o mais letal, sendo responsável por cerca de 1,8 milhão (18,4% do total) de mortes estimadas no ano de 2018 no mundo (INCA, 2019).

Em virtude disso, esforços na área da biomedicina ampliam estudos direcionados contra o câncer, tanto para fins diagnósticos quanto terapêuticos com o objetivo de contrariar essa estatística. O desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, detecção precoce e intervenção na progressão do câncer tem sido crescente, tendo em vista a robustez de conhecimento adquirido acerca das investigações sobre as causas da doença (BARUA *et al.*, 2016).

1.1.1 Tratamento

Os tipos de tratamentos utilizados dependem do tipo de câncer e de quão avançado o tumor está. Dependendo da situação específica, pode ser utilizado somente um tratamento ou uma combinação deles. Os métodos mais utilizados atualmente para o tratamento do câncer são a ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (TRAPANI, 2017). A cirurgia oncológica consiste na remoção total ou o máximo possível do tumor. A quimioterapia utiliza medicamentos que se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo que elas se espalhem pelo corpo (INCA, 2019). A quimioterapia pode ser administrada por via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica. A radioterapia utiliza feixes de energia de alta potência (como raios-X ou prótons), para matar ou impedir que as células cancerígenas aumentem. Pode ser feita por radiação externa, com a radiação vindo de uma máquina fora do corpo ou por radiação interna, com a colocação de aplicadores no local a ser tratado, onde a radiação é emitida do aparelho para os aplicadores (braquiterapia) (INCA, 2019).

No entanto, apesar da cirurgia, há muita recorrência do tumor, com o elevado número de tumores reaparecendo no local primário (WANG *et al.*, 2019). A radioterapia e os quimioterápicos disponíveis atualmente afetam também as células saudáveis, especialmente de medula óssea e tecidos epiteliais. A morte de células saudáveis pode levar a efeitos colaterais, como alterações na pele, perda de cabelo, diarreia, feridas na boca, enjoo e vômitos (SAKURADA, 2018). Além disso, essas terapias antitumorais podem ter o uso bastante

limitado devido ao desenvolvimento de resistência que ocorre por fatores, que incluem alterações na molécula alvo da droga, ativação de vias pro-sobrevivência, e a ineficaz indução de morte celular (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020; CUI *et al.*, 2020).

O surgimento de fenótipos de câncer multirresistentes e os efeitos colaterais gerados, atenuam drasticamente a eficiência dos tratamentos antitumorais mais comumente utilizados. Portanto, há uma necessidade urgente de projetar novos agentes terapêuticos e propor abordagens inovadoras capazes de derrotar células cancerígenas resistentes. Nesse contexto, estudos na área de nanotecnologia trazem as nanopartículas de metais nobres, como a prata, como agentes anticâncer promissores, capazes de aprimorar ou até mesmo substituir atuais abordagens usadas contra o câncer (MORFOLO *et al.*, 2020). Estudos demonstram a eficácia de nanopartículas de prata como um agente antitumoral tanto em *in vitro* quanto em *in vivo*. Por exemplo, as nanopartículas de prata possuem efeito antiproliferativo em células cancerígenas usando linhas celulares de Linfoma de Dalton (DLA) (SRIRAM *et al.*, 2017), possuem a capacidade de melhorar o efeito de outras drogas contra células cancerígenas (GARG; GARG, 2018) e ainda aumentam a sensibilidade de células de Glioma Humano *in vitro* (LIU *et al.*, 2018).

1.2 Nanotecnologia

Nanotecnologia é o conjunto de tecnologias, processos e técnicas para o desenvolvimento de novos materiais ao nível atômico e molecular com pelo menos uma das dimensões em escala nanométrica, estruturas entre 1 e 100 nanômetros chamados de nanomateriais. Inicialmente, em 1960 os primeiros conceitos sobre a nanotecnologia foram apresentados por um dos mais influentes físicos século XX, o professor Richard Feynman em sua palestra com o tema “*There’s plenty of room the bottom*” – “Há muito espaço lá embaixo”, em tradução livre. Feynman explorou a possibilidade de manipular materiais na escala de átomos e moléculas individuais e afirmou que a manipulação e o controle da matéria em pequena escala seriam o futuro da ciência (FEYNMAN, 1960; APOLINÁRIO *et al.*, 2020). No entanto, o termo “nanotecnologia” só foi usado em 1974 pelo pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, se referindo a capacidade da engenharia de materiais em nível nanométrico (TANIGUCHI, 1974; YANG *et al.*, 2019). Alguns anos depois, em 1981, foi desenvolvido o microscópio de tunelamento pelos físicos Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, que foram homenageados com o Prêmio Nobel de Física em 1986. Esse

microscópio permitiu a visualização e manipulação de átomos individuais. Essa manipulação foi evidenciada em 1989, quando os cientistas da IBM usaram um microscópio de varredura por tunelamento para manipular 35 átomos de xenônio individuais em um substrato de cristal de níquel resfriado e formar as letras IBM (Figura 2A). Um dos logotipos mais reconhecidos do mundo também é o menor do mundo (LOOS, 2017). A partir de então, a nanotecnologia começou a se desenvolver, começando a era da nanociência, área capaz de manipular sistemas físicos, químicos e biológicos para produzir materiais em escalas atômica, molecular e macromolecular e aplica-los em diversos setores industriais (CREWE *et al.*, 1970; ALBERNAZ, 2015; LOOS, 2017).

Recentemente, de forma inovadora pesquisadores do Inmetro gravaram em grafeno a menor marca do instituto já registrada (Figura 2B). A logo foi desenhada em nanoescala, por meio da técnica de feixe de íons de hélio, no microscópio Orion, instalado na Divisão de Metrologia de Materiais (Dimat) (o único do tipo na América Latina) e visualizada pela técnica de Nanoespectroscopia Raman (TERS) (INMETRO, 2020).

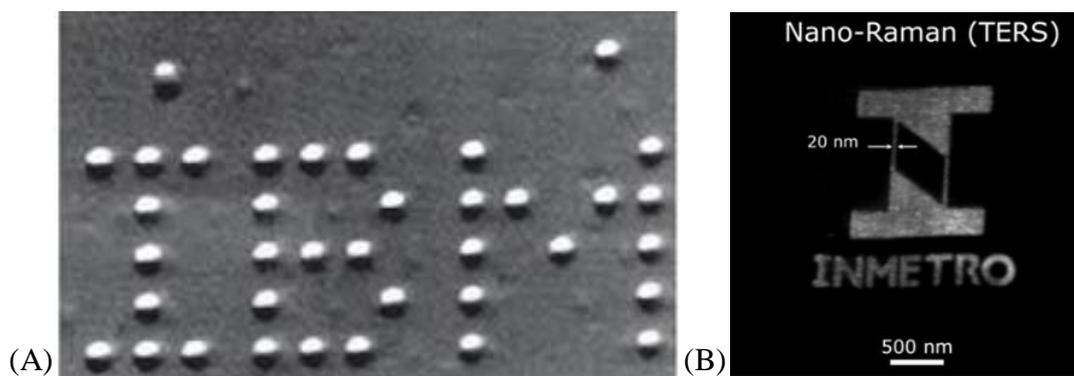


Figura 2. Visualização e manipulação de átomos com microscopia. (A) Logotipo da empresa IBM e (B) marca do Inmetro gravada no grafeno. (Adaptado de IBM disponível em <https://www.ibm.com/ibm/history/ibm100/us/em/icons/microscope/breakthroughs/>; <https://www4.inmetro.gov.br/noticias/inmetro-em-nanoescala-menor-marca-do-instituto-gravada-em-grafeno-e-lida-com-luz-visivel>).

Assim, uma revolução tem vindo a acontecer na ciência e na tecnologia desde que concluíram que os materiais em escala nanométrica podem apresentar novos comportamentos e/ou características diferentes daquelas que geralmente os materiais apresentam em escala macroscópica. Por exemplo, nanopartículas apresentam maior relação superfície/volume em relação ao mesmo material em maior escala, o que as tornam mais reativas e mais tóxicas

(YANG *et al.*, 2019). A fabricação de materiais nano-estruturados abre novas perspectivas de avanços tecnológicos e um grande desafio de entender melhor esses nanomateriais. Além disso, a nanotecnologia é um campo bastante interdisciplinar, que engloba muitas áreas de pesquisa, dos diversos setores da indústria e de áreas estratégicas (Figura 3). Existem mais de 600 itens desenvolvidos com nanotecnologia. A escala tão reduzida oferece uma vantagem fundamental, além de viabilizar o rearranjo de átomos de modo que formem materiais com novas e melhoradas funções. Propicia também, a criação de aparelhos mais leves e com maior capacidade de memória, uma vez que, em proporções nanométricas passam a caber mais recursos no mesmo lugar (BAI *et al.*, 2020).

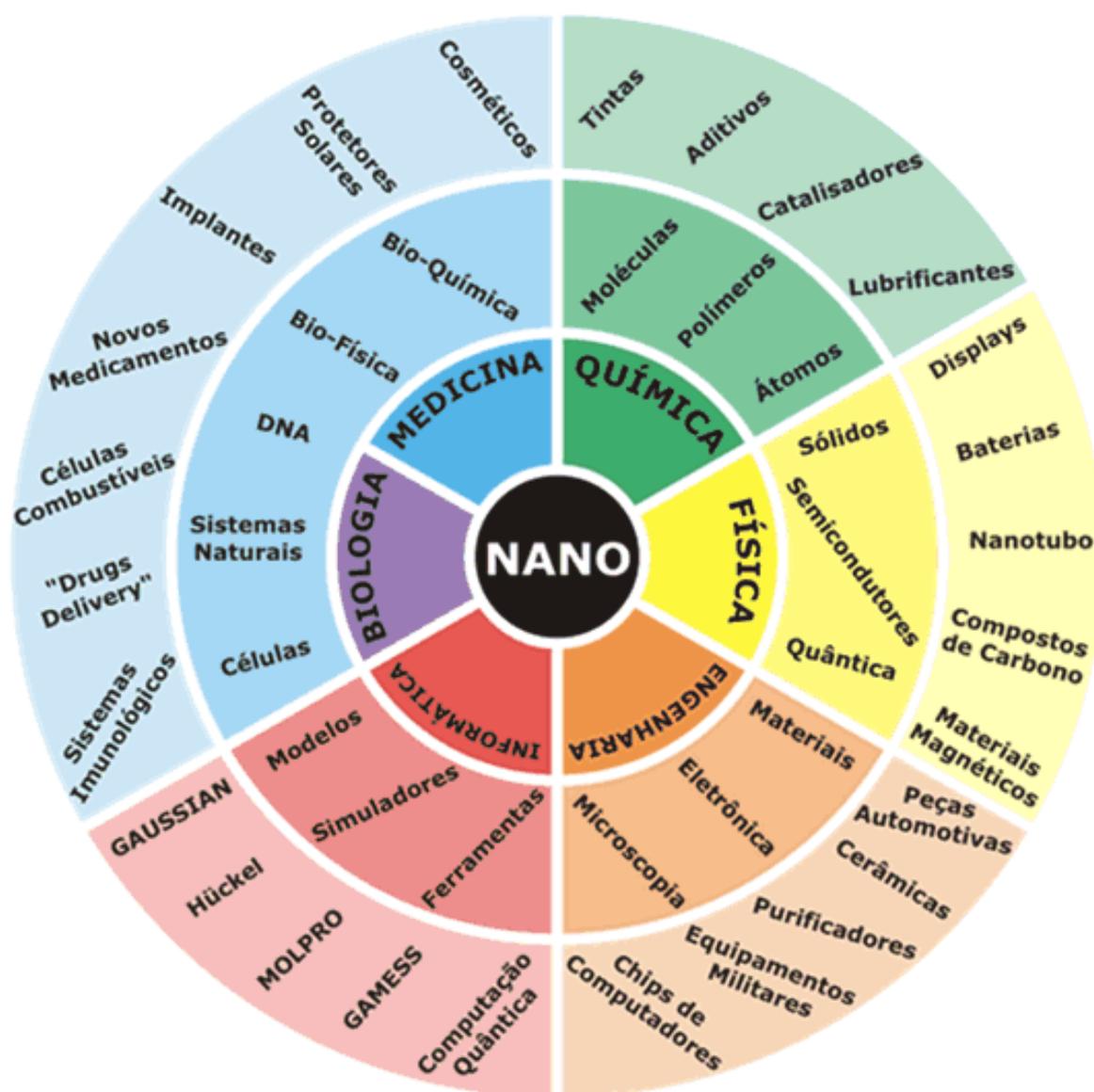


Figura 3. Nanotecnologia e suas aplicações (MESQUITA, 2014).

1.2.1 Nanobiotecnologia

O termo biotecnologia foi descrito pela primeira vez em 1919 por Karl Ereky, como uma área que utiliza conceitos e princípios biológicos e de engenharia, tais como características metabólicas, componentes e produtos celulares para desenvolver novas tecnologias e ferramentas aplicadas nas mais diversas áreas, visando melhorar o meio ambiente e a saúde humana (VERMA, *et al* 2011). Esse é um processo tecnológico que permite a utilização de material biológico ou parte dele para a criação ou aperfeiçoamento de produtos ou serviços. Podemos exemplificar a presença de princípios biotecnológicos na obtenção ou modificação de produtos para uso em saúde humana ou animal, no melhoramento de plantas e animais. Além disso, o desenvolvimento e aplicação de microrganismos para usos específicos na indústria, na saúde e nos processos relativos ao meio ambiente e ao desenvolvimento sustentável, assim como na modificação e desenvolvimento de novos processos industriais já é uma realidade (JAIN, 2020; LIAO; LI; TJONG, 2019).

A nanobiotecnologia é a interface da nanotecnologia e da biotecnologia e inclui a aplicação nas ciências da vida. Portanto, um material considerado nanobiotecnológico contém além de pelo menos um componente funcional com tamanho em nanoescala, possuem também, aplicações nas áreas biológicas, como saúde, biologia, bioquímica, biomedicina ou medicina (PAULL *et al.*, 2003). Este ramo da nanotecnologia é amplamente aplicável em novas técnicas de imagem molecular, usadas para diagnosticar doenças em estágios iniciais, para entender os efeitos das terapias, em ferramentas analíticas quantitativas que dão uma ideia de como a célula age no nível molecular, na descoberta de medicamentos e dispositivos de distribuição de drogas, em novas terapias ou novos biomateriais, entre outras aplicações (MORAIS *et al.*, 2014; JAIN, 2020).

1.3 Nanopartículas

O termo nanomaterial é normalmente referido como sendo qualquer material natural, acidental ou produzidos artificialmente que contenha partículas, agregadas ou livres, e nas quais 50% da sua população contenha uma ou mais dimensões externas em escala na faixa de tamanho entre os 1 e 100 nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Os nanomateriais atualmente podem ser classificados em quatro categorias baseadas em seu material de origem: nanomateriais à de carbono, nanomateriais de base inorgânica, nanomateriais de base orgânica, e nanomateriais compostos (JEEVANANDAM *et al.*, 2018). Dessas diferentes

origens, surgem vários tipos de nanomateriais, como nanotubos, nanofibras, dendrímeros, micelas, lipossomas e nanopartículas (NPs).

Entre os materiais em nanoescala, as nanopartículas se destacam, pois podem exibir características completamente novas ou melhoradas baseadas nas suas características específicas, quando comparadas com partículas de maiores dimensões da mesma fonte que as nanopartículas foram formadas (YANG *et al.*, 2019). Essas propriedades das NPs surgem a partir da combinação de quatro fatores básicos (Figura 4): o tamanho, que para ser classificado como NPs, o tamanho deve ser entre 1 e 100nm; o material, que pode ser orgânico e inorgânico, dando origem a diversas classes de NPs; o formato, tais como esférico, cúbico e em bastão, dependendo do tipo de material que se encontra na base da sua formação; e a composição de sua superfície, que pode ser nuas ou funcionalizada, a partir da adição de grupos funcionais e cargas (BAI *et al.*, 2020).

Existem um grande número de nanopartículas com as mais diversas aplicações em várias áreas. No campo da nanobiotecnologia, por exemplo, são amplamente aplicadas para abastecer setores da indústria têxtil, inibindo o crescimento de bactérias e fungos em tecidos e na indústria farmacêutica como carreadoras de fármacos e no meio ambiente como remediadores. As NPs podem ser divididas em dois grandes grupos, as NPs não-metálicas e as NPs metálicas. Todas têm potencial de desempenhar um enorme papel no desenvolvimento de novas tecnologias (ZHANG, 2018).

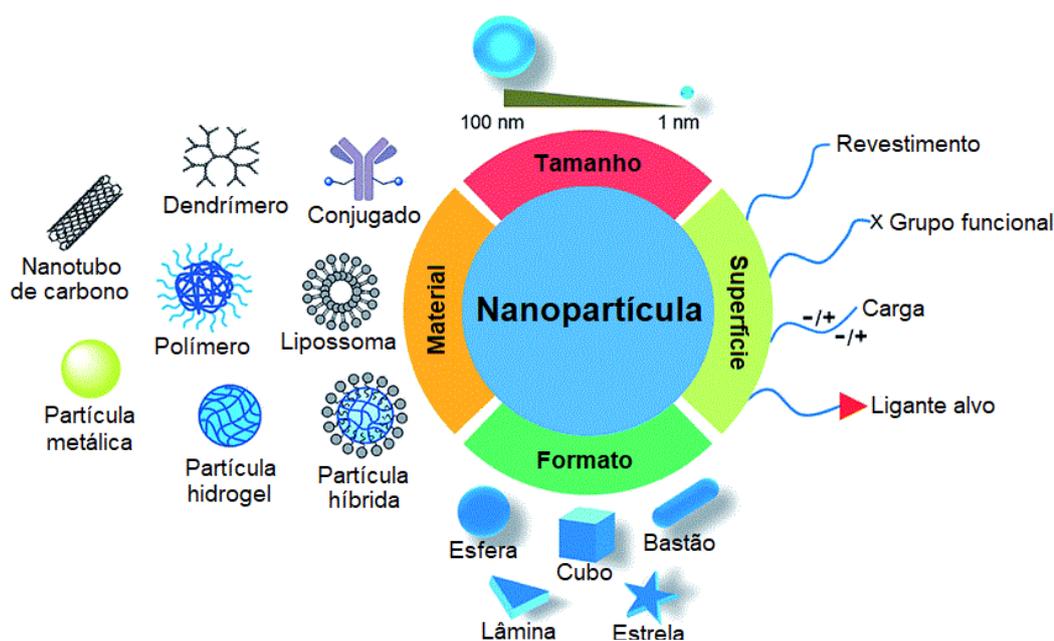


Figura 4. Diferentes fatores que podem influenciar nas propriedades físico-químicas únicas das NPs (Adaptado de SUN *et al.*, 2014).

1.3.1 Nanopartículas Não-metálicas

Atualmente existem diferentes tipos de nanopartículas não-metálicas, onde podemos citar as NPs à base de carbono, como as NPs de fulereno (nano-C₆₀) que vêm sendo testadas para atuarem como sensores e catalisadores e, podem também ser usadas para liberação controlada de fármacos. Estudos mostraram que as NPs de C₆₀ melhoram os parâmetros sanguíneos e hepáticos alterados pelas toxicidades induzidas pela ciclofosfamida (agente quimioterápico) (ELSHATER *et al.*, 2018) e também serem capazes de reduzir os danos ao DNA e diminuir as aberrações cromossômicas (ALY; OTHMAN; HARIDY, 2018). Abrindo um campo interessante a respeito de seu potencial uso como agente antígeno-tóxico contra os efeitos colaterais deletérios dos quimioterápicos. Outro tipo de NPs não-metálicas são as Nps de base orgânica, como por exemplo os lipossomas, que podem aumentar significativamente a circulação sanguínea das sondas carregadas e levar a um maior acúmulo no tecido tumoral alvo em imagiologia molecular, que é muito importante no diagnóstico e prognóstico de doenças (XIA *et al.*, 2019). Os lipossomas podem atuar também como transportadores inaláveis no tratamento de infecções pulmonares (KHAN; CHAUDARY, 2020).

1.3.2 Nanopartículas Metálicas

Nanopartículas metálicas (NPMs) são nanopartículas que podem ter em sua composição diferentes metais como a prata, o ouro e o cobre. Devido a sua aumentada razão entre área de superfície e volume, estas nanoestruturas de metal possuem propriedades ópticas, químicas e elétricas que dependem de seu tamanho e diferem do seu material em escala macro (ADEWALE *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019). Em nanoescala, alguns metais possuem uma acentuada absorção de luz na região visível do espectro, exibindo coloração distinta dos materiais em grande escala, como exemplo, o ouro, enquanto sólido micro ou macroestruturado, possui a cor amarela, nanopartículas de ouro (AuNPs) de 100 nm apresentam uma cor púrpura-rosado, enquanto que NPs de 20 nm são vermelhas e as de 1 nm são de cor marrom-amarelada (ALBERNAZ, 2014; HE *et al.*, 2019). Esta absorção é atribuída ao fenômeno denominado Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL), que consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres na superfície das nanopartículas, criando uma densidade de carga na sua superfície. Ou seja, a oscilação coletiva de elétrons em resposta ao campo elétrico da radiação eletromagnética de luz, em parte porque cargas são deslocadas de modo transiente na superfície da partícula durante a oscilação de elétrons. Este

fenômeno ocorre devido as mudanças em propriedades físico-químicas da matéria, incluindo mudanças ópticas, elétricas e magnéticas que estão relacionadas com o tamanho das NPMs e também pela razão entre a área de superfície e o volume das NPMs que aumenta significativamente com a diminuição do seu diâmetro, fazendo com que elas se tornem mais reativas (HE *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2018).

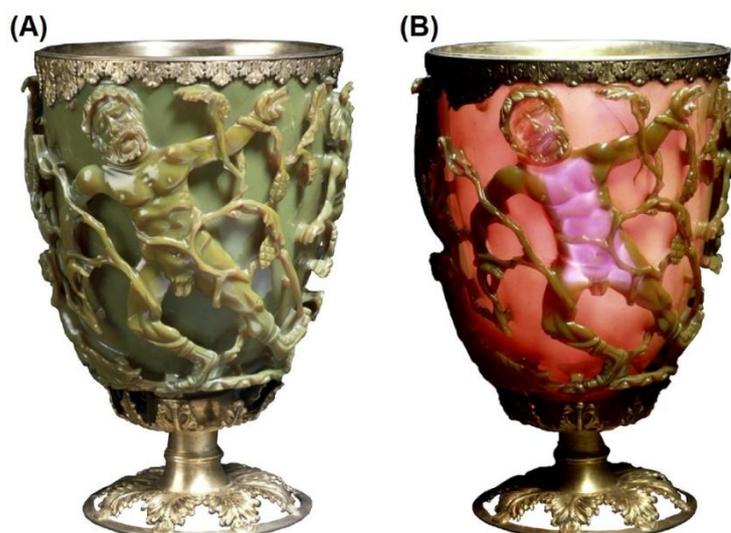


Figura 5. Taça de Lycurgus. O vidro aparece verde quando iluminado por fora (A) e vermelho-púrpura quando iluminado por dentro (B) (KOOL *et al.*, 2020).

Embora a nanotecnologia seja uma área da ciência relativamente nova, o uso das de materiais em nanoescala como as NPMs ocorre há séculos. A Taça de Lycurgus, do Império Romano do século IV d.C, é admirada mundialmente, principalmente por sua fascinante propriedade dicróica (duas cores). A taça apresenta uma cor verde quando o observador e a fonte de luz estão no mesmo lado (reflexão) e uma cor vermelha-púrpura quando o observador e a fonte de luz estão em lados opostos (transmissão) (Figura 5) (KOOL *et. al*, 2020). O que deixou os cientistas perplexos por séculos, até que se descobriu que esse efeito ocorre devido à presença de nanopartículas no vidro. Este efeito é devido a duas nanopartículas metálicas diferentes: nanopartículas de prata com tamanho >40 nm, que causam a reflexão verde e nanopartículas de ouro, responsáveis pela cor plasmônica vermelha, resultado da absorção da luz (~ 520 nm) (LOOS, 2017; KOOL *et. al*, 2020). Além dos romanos, os artesãos medievais também exploraram as características ópticas nas NPMs, com a adição de partículas de metal no vidro para criar vitrais.

Além do tamanho, essas características únicas e a reatividade das NPMs são dependentes de outros fatores, entre eles: a concentração e o estado de agregação, que estão relacionados com a reatividade, devido à razão área de superfície/volume; a forma, relacionada também com a área de superfície, com a condutividade e reatividade da NPM; e o recobrimento da NPM, que vai moldar a sua interação com outros sistemas (BAI *et al.*, 2020). Essas propriedades conferem às NPMs várias opções de aplicação na medicina (diagnóstico, tratamento), na farmácia (sistemas de entrega de medicamentos), na área cosmética (protetores solares), na indústria alimentícia e têxtil (embalagens e tecidos antimicrobianos), na engenharia (painéis solares), entre outros (KLEBOWSKI *et. al*, 2019).

1.3.3 Síntese de Nanopartículas

A síntese de nanopartículas metálicas pode ser feita por duas diferentes abordagens, conhecidas como “*bottom-up*” (de baixo para cima) ou a “*Top-down*” (de cima para baixo) (Figura 6). Na abordagem *bottom-up* os elementos que compõe o nanomaterial se unem para sua formação, construindo átomo-a-átomo ou molécula-por-molécula. Esta estratégia pode ocorrer por síntese química, biológica, auto-agregação ou nanoimpressão. Na abordagem *Top-down* o nanomaterial é produzido a partir do material em maior escala (micro ou macro), que é então desconstruído por métodos físicos ou químicos até atingir a nanoescala (BHUSHAN, 2016; SILVA *et al.*, 2017).

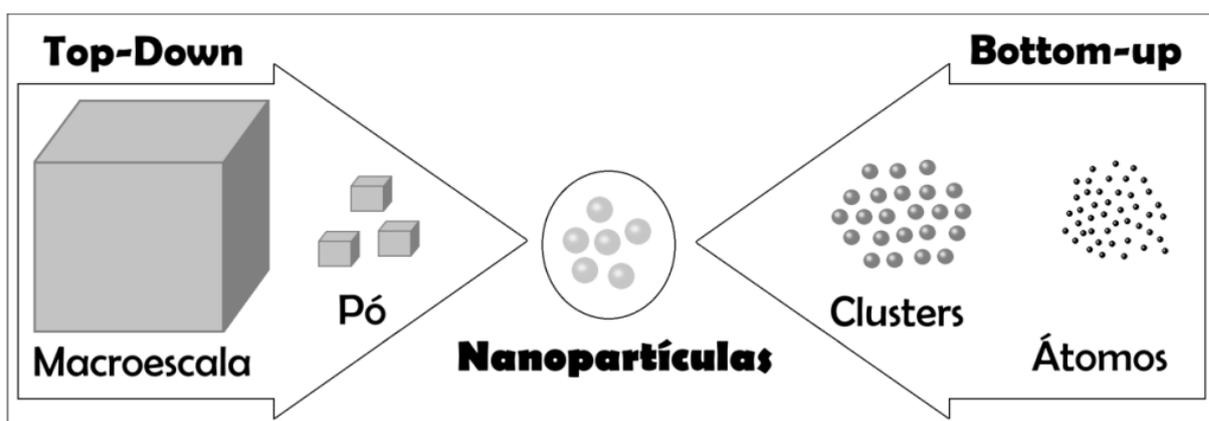


Figura 6. Desenho esquemático das abordagens *Top-down* e *Bottom-up* para a síntese de nanomateriais (Fonte: RAWAT, 2015).

As NPMs podem ser produzidas por síntese química, física ou biológica. Alternativamente, a síntese biológica ou síntese verde vem ganhando considerável

importância nos últimos anos. Essa síntese tem como objetivo principal a utilização microrganismos (fungos, bactérias, algas e leveduras) ou extratos vegetais como agente redutor. Essa técnica é uma alternativa sustentável e ecologicamente viável (ALBERNAZ, 2014; DONG *et al.*, 2020). As desvantagens da síntese biogênica podem ser elencadas como a maior dificuldade de escalonamento e rendimento das nanopartículas e, portanto, mais estudos são necessários para o seu desenvolvimento (DURÁN *et al.*, 2019).

Na síntese física podem ser utilizados métodos como o de atrito, onde partículas são moídas até serem reduzidas de tamanho, ou pirólise, que utiliza um precursor orgânico que é queimado sob alta pressão. As abordagens de sínteses físicas são capazes de sintetizar grandes quantidades de NPMs com alta pureza. Porém, as NPMs produzidas fisicamente tendem a aglomerar, o que costuma ser um grande desafio, pois não são utilizados agentes de capeamento. Além disso, consomem mais energia e exigem uma duração relativamente mais longa de síntese e equipamentos complexos, os quais aumentam seu custo operacional (SAKONO *et al.*, 2020).

O método de síntese química vem sendo a rota mais aplicada na síntese de NPs metálicas, caracterizada por uma dispersão em solução aquosa ou solvente orgânico, reduzindo seus sais metálicos. Vários sais metálicos são usados para fabricar NPMs, como ouro, prata, ferro, óxido de zinco, cobre, platina. Além disso, os agentes de redução e capeamento podem ser facilmente alterados ou modificados para alcançar as características desejadas das NPMs em termos de distribuição de tamanho, forma e taxa de dispersão (SLEPIČKA *et al.*, 2019). As NPMs são quimicamente sintetizadas principalmente pela síntese de Brust-Schiffrin synthesis (BSS) que faz utilização do borohidreto de sódio como agente redutor e estabilizados com tiolato ou pelo método de Turkevich-Frens, que utiliza o citrato trissódico como agente estabilizador e redutor (LEE; JUN, 2019). A síntese química forma NPMs com considerável reprodutibilidade, permitindo o maior controle do tamanho e dispersão das nanopartículas, controlando os parâmetros experimentais. Além disso, a síntese química também apresenta versatilidade e outros agentes redutores utilizados são o poli (álcoolvinílico) (PVA) e poli (etilenoglicol) (PEG), polímeros biocompatíveis que também atuam como agente estabilizantes. A utilização de agentes estabilizadores serve para evitar a agregação dessas NPMs. Sendo assim, esses métodos apresentam baixo custo e boa produtividade e estabilidade de NPMs (DURÁN *et al.*, 2019).

1.4 Nanopartículas de Prata

Dentre os vários tipos de NPMs, as nanopartículas de prata (AgNPs) são mais conhecidas e são majoritariamente escolhidas, tanto para estudo quanto para aplicações em diversas áreas industriais e biomédicas. São amplamente conhecidas por seus efeitos antimicrobianas e anti-inflamatórias (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019). Acredita-se que a prata já era conhecida e usada há muitos séculos atrás. Ao longo da história, a prata e os seus compostos têm sido amplamente utilizados em várias aplicações, como resultado das suas propriedades bastante úteis. Exemplos disso, são os vasos de prata que eram utilizados para manter a água limpa e segura. Ela também era usada para evitar contaminação por microrganismos em feridas e além de remédios caseiros, a prata era aplicada no tratamento dos olhos e no tratamento de úlceras de pele e para prevenir a infecção de feridas antes do surgimento dos antibióticos (LOOS, 2017).

Atualmente, a prata está em entre os elementos mais usados na indústria. As AgNPs, em termos de número de produto, é um dos nanomateriais com o mais alto grau de comercialização. Curiosamente, o Projeto sobre Nanotecnologias Emergentes informou que as AgNPs ficaram em primeiro lugar na produção anual entre todos os nanomateriais, 442 de todos os produtos atualmente registrados nas bases de dados de nano-produtos indicam conter nanopartículas de prata em sua composição (REZVANI *et al.*, 2019). Isso, devido a sua alta capacidade antimicrobiana para uma ampla variedade de organismos e aos pouquíssimos casos de resistência a esse metal, o trouxe como uma alternativa para tratamentos de patologias que enfrentam quadros de resistência a drogas. Sendo amplamente estudadas e bastante utilizadas como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, em uma variada gama de produtos, incluindo meias, travesseiros, chapinhas de cabelo, cosméticos, detergentes, sabão, shampoo, pasta de dente, máquinas de lavar roupa, embalagens para armazenar alimentos, entre outros, (OSTASZEWSKA *et al.*, 2018).

Além disso, podem ser utilizadas como carreadores para drogas abrindo diversas possibilidades para a síntese e utilização de drogas, inclusive para o tratamento de câncer, de filmes nano-estruturados, arcabouços para implantes de tecidos, dispositivos ortopédicos, ataduras, sprays antissépticos e cateteres (BURDUŞEL *et al.*, 2018). Também podem ser funcionalizadas para uso em testes diagnósticos ou para alcançar um tipo celular ou um tecido específico e podem ser empregadas como contraste para exames de ressonância nuclear magnética ou raios X (LEE; JUN, 2019). As principais características físico-químicas dos

AgNPs, que são os responsáveis por suas eficiências incluem forma, tamanho, carga superficial, tendência de aglomeração, revestimento, taxa de dissolução, interações biológicas e outros impactos. Por exemplo, a forma das AgNPs tem um efeito nas propriedades físicas e químicas das AgNPs, tamanhos menores têm grandes áreas de superfície e possuem toxicidades maior e a carga superficial dos AgNPs é responsável pela ligação ou interação eficiente com os sistemas biológicos ou vivos (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2019).

1.4 Aplicações Biomédicas das AgNPs

As AgNPs vêm contribuindo com grandes avanços na Biomedicina. São utilizadas em revestimentos de biomateriais e dispositivos médicos, materiais de restauração e regeneração de tecidos, alternativas terapêuticas com melhor desempenho, por sua ação antimicrobiana, aumentando a eficiência e a especificidade de contra agentes infecciosos (BURDUŞEL *et al.*, 2018). São também estudadas como terapia fototérmica (MARCANO, 2018), detecção de biomarcadores (ZHOU *et al.*, 2019) e diagnóstico (LEE; JUN, 2019). Em estudos tem demonstrado ser capaz de aumentar a eficiência e a segurança dos medicamentos, melhorando a biodisponibilidade, fornecendo entrega direcionada, aumentando a estabilidade e estendendo o efeito do medicamento no tecido alvo, quando utilizadas como carreadores para drogas ou bioconjugadas (AMARNATH PRAPHA KAR *et al.*, 2018).

As nanopartículas de prata possuem efeito antibacteriano contra um amplo grupo de bactérias Gram-positivas, como as *Bacillus spp*, *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp.*, e também Gram-negativas, como as *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, inclusive cepas resistentes a antibióticos (RIBEIRO *et al.*, 2018). Nosso grupo já evidenciou a eficiência das AgCl-NPs (FERREIRA *et al.*, 2017) e das Ag/AgCl-NPs (EUGENIO *et al.*, 2016) contra bactérias Gram positivas e Gram negativas de importância médica, como *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. As AgNPs são capazes de inibir a formação de biofilmes bacterianos, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com conseqüente fragmentação do DNA e morte celular (RIBEIRO *et al.*, 2018). AgNPs podem ainda ter efeito sinérgico com antibióticos por meio de alterações na permeabilidade membranar e danos na parede celular, que facilitariam a entrada do antibiótico nas células e inibir a atividade de enzimas que degradam os antibióticos (SMEKALOVA *et al.*, 2016).

AgNPs também possuem atividade antifúngica, capazes não só de inibir a formação de biofilme, mas também são eficazes contra biofilmes já formados por fungos, como *Aspergillus spp* (BOCATE *et al.*, 2019) e *Candida spp* (JALAL *et al.*, 2019). Alguns estudos mostram ainda que nanopartículas de prata possuem atividade antiviral (KHALID *et al.*, 2017), larvicida e pupicida (GA'AL *et al.*, 2018) e anti-parasitário (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019). Essas atividades das nanopartículas de prata ainda são pouco exploradas, em relação a ação bactericida que recebe maior atenção, mas apresentam um grande potencial a serem melhor estudadas.

Além disso, a atividade antitumoral de AgNPs já foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* em diversas linhagens celulares de câncer como MCF-7 (adenocarcinoma mamário) (ALMALKI; KHALIFA, 2020), U87 (glioblastoma) (MORFOLO *et al.*, 2020), HeLa (câncer cervical) (MURUGESAN *et al.*, 2019) e KB (carcinoma epitelial oral) (BARUA *et al.*, 2016), nelas realizam uma atividade citotóxica dependente da dose, induzindo danos celulares após a exposição a AgNPs, tais como perda de integridade da membrana celular, despolarização mitocondrial, o stress oxidativo, danos no DNA e apoptose. O que precisa ser ainda mais explorado para melhor entender os mecanismos pelo qual leva a morte celular. Além desses, outros tipos de câncer foram estudados e apresentam sensibilidade ao tratamento com AgNPs (MORFOLO *et al.*, 2020).

1.5 Mecanismo de Ação das AgNPS

Na literatura, teorias que explicam o mecanismo de ação de NPs indicam que o processo começa com a interação entre as NPs ou os íons dissociados com a membrana celular. As membranas celulares são semipermeáveis, permitindo seletivamente que algumas moléculas/íons passem por diferentes mecanismos. Por exemplo, moléculas pequenas e apolares, água e gases como o oxigênio e o gás carbônico conseguem atravessar a membrana por difusão com base em seus gradientes de concentração. Moléculas como aminoácidos e vários íons se movem através da membrana celular por transporte ativo mediado por bombas de proteínas da membrana (AHMAD *et al.*, 2019; JENTSCH, 2016). No entanto, para entrar nas células, moléculas maiores e hidrofílicas dependem dos processos de endocitose, uma forma de transporte ativo, onde as células encapsulam objetos com membrana citoplasmática, resultando na formação de vesículas. A principal via de entrada das NPs na maioria das

células de mamíferos é a captação por endocitose, podendo ou não ser um transporte mediada por clatrina e depende de caveolina (VAN HAUTE *et al.*, 2018; PONGRAC *et al.*, 2018).

As NPs se adaptam ao sistema de captação celular através de diferentes características físico-químicas, como tamanho, forma, química da superfície e cargas superficiais, as quais desempenham um papel vital na captação celular de NPs (CARNOVALE *et al.*, 2019).

A eficácia de absorção dos AgNPs está correlacionada com o tamanho das partículas. Em estudos feitos por WU *et al.* (2019) em linhagem celular de melanoma de camundongo (B16), AgNPs de 20 nm e 100 nm apresentaram a maior e a menor eficiência de captação, respectivamente. Isso revelou que 20 nm podem entrar e sair das células mais facilmente. AgNPs menores exibem uma capacidade aprimorada de serem captadas, localizando-se no interior da célula, provocando uma toxicidade mais alta. Devido ao aumento da área superficial, que se correlaciona com uma maior taxa de liberação de íons Ag^+ no meio de cultura celular. Por outro lado, em um estudo usando AgNPs de 15, 50 nm, se demonstrou que os AgNPs de 50 nm exibem a maior adsorção e captação passiva de glóbulos vermelhos (RBCs), enquanto as menores AgNPs de 15 nm são mais citotóxicas (PANZARINI *et al.*, 2018).

A forma das nanopartículas também pode influenciar na sua captação celular. Estudos feitos com NPs de diferentes formatos, mostraram que AgNPs esféricas (30 nm) são endocitadas pelas células A549 (Carcinoma pulmonar) de maneira eficiente, enquanto fios de prata (comprimento: 1,5 – 25 μm ; diâmetro 100–160 nm) são observados dentro das células em uma quantidade bem menor. Devido à curvatura, as NPs esféricas têm uma maior probabilidade de internalização do que os de forma assimétrica. Quando a citotoxicidade é considerada, os nanofios de prata induzem uma citotoxicidade muito alta em comparação com as nanoesferas de prata. Isso pode ser devido à interação entre os nanofios de prata e a membrana plasmática, em vez do mecanismo de endocitose (KANIPANDIAN; KANNAN, 2019).

As propriedades da sua superfície são outra característica importante das AgNPs que podem ser moduladas para afetar positiva ou negativamente a captação. Para melhorar a estabilidade, dispersibilidade, aglomeração e conferir novas funções aos AgNPs, diferentes de moléculas podem ser usadas para revestir as NPs (ROSÁRIO *et al.*, 2018). Por exemplo, em células tronco neurais de camundongos tratadas com AgNPs, foi visto que as NPs cobertas com AOT (bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio), PVP (polivinilpirrolidona) e

PLL (Poli-L-Lisina) tiveram uma captação celular maior do que as AgNPs cobertas com BSA (Albumina do Soro Bovino) e CTAB (Brometo de Cetrimônio). E também a maior toxicidade foi vista em NPs revestidas com CTAB e PLL, o que pode ser explicado por interações eletrostáticas mais fortes entre AgNPs com carga positiva e superfície celular com carga negativa (PONGRAC *et al.*, 2018).

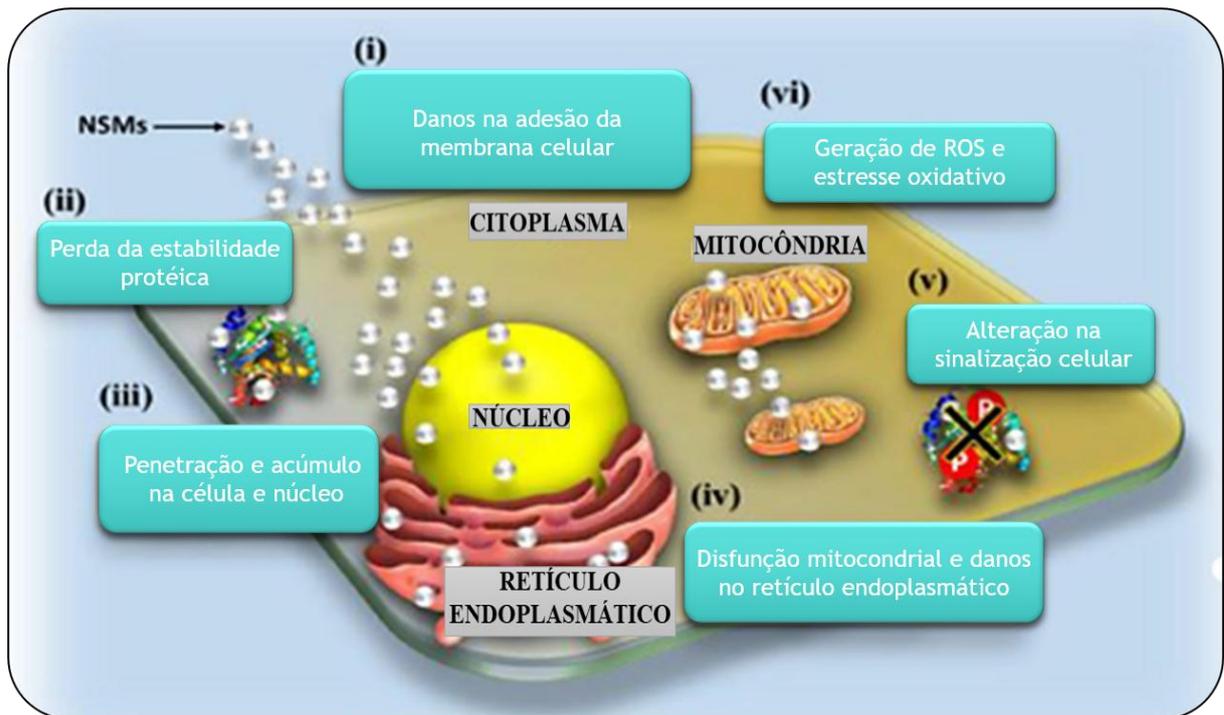


Figura 7. Mecanismos de citotoxicidade gerados pelas AgNPs na célula. (i) Danos na adesão da membrana celular, (ii) Perda da estabilidade proteica, (iii) Penetração e acúmulo na célula e núcleo, (iv) Disfunção mitocondrial e danos no retículo endoplasmático, (v) Alteração na sinalização celular, (vi) Geração de ROS e estresse oxidativo (Adaptado de BARANWAL *et al.*, 2018).

A citotoxicidade associada as AgNPs estão relacionadas à liberação de íons Ag^+ decorrentes da dissolução das AgNPs e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar diferentes danos celulares (Figura 7). Uma vez internalizadas, as nanopartículas translocam-se para as mitocôndrias e núcleo. Ocasionalmente causam danos na adesão da membrana celular, interrupção do transporte de elétrons e vias de transdução de sinal. O aumento dos níveis de ROS e outros radicais livres resulta em disfunção mitocondrial e danos no retículo endoplasmático, em proteínas e ao DNA, que posteriormente causam efeitos

genotóxico e consequente alteração da morfologia celular e indução de apoptose ou necrose celular (PANZARINI *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2019; ZOU; ZHU; LI, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que tenha sido responsável por 10 milhões de mortes em 2020 (WHO, 2021). O câncer é atualmente tratado por quimioterapia, radioterapia ou por meio de cirurgias. Os quimioterápicos disponíveis atualmente para o tratamento de neoplasias afetam também as células saudáveis, especialmente de medula óssea, tecidos epiteliais, do sistema retículo-endotelial e gônadas (HASSANNIA *et al.*, 2019). Além disso, muitas terapias antitumorais têm uso bastante limitado devido ao desenvolvimento de resistência (AN *et al.*, 2021). A resistência a quimioterápicos antitumorais depende de diversos fatores, entre eles a variabilidade individual de pacientes que podem apresentar baixa absorção do quimioterápico ou metabolização e excreção muito rápidas, fazendo com que a concentração da droga fique abaixo dos níveis ótimos, por exemplo. Além de alterações na molécula alvo do tratamento e a falha na indução de morte celular (REIDY *et al.*, 2019). Devido a isto, investimentos em novos métodos terapêuticos vem crescendo ao longo dos anos, entre eles, o estudo da utilização de nanopartículas metálicas como agentes antitumorais (AHUJA; RAWAT, 2018). Neste contexto, as nanopartículas de prata, têm sido demonstradas eficientes no tratamento de câncer *in vivo* e *in vitro* com múltiplos mecanismos de citotoxicidade como a indução de danos ao DNA, lisossomos e às mitocôndrias com indução da produção de ROS que pode levar a apoptose e peroxidação de lipídeos (REIDY *et al.*, 2019). O fato de agirem simultaneamente por várias vias é a principal vantagem das nanopartículas em relação aos quimioterápicos, porque dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte das células neoplásicas (PATIL *et al.*, 2017). Apesar de ainda aparentar distante, uma terapia para neoplasias usando nanopartículas de prata pode significar um avanço enorme na qualidade e longevidade para os pacientes. Sendo assim, é importante avaliar o efeito destas nanopartículas contra células tumorais e não tumorais buscando compreender os efeitos dessas nanopartículas nas células.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é analisar o efeito das nanopartículas de prata em células de linhagens humanas tumorais e não tumorais como uma alternativa para o combate ao câncer.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Analisar o efeito das nanopartículas de prata na proliferação células tumorais e não tumorais
- II. Analisar o efeito das nanopartículas de prata na viabilidade de células tumorais e não tumorais
- III. Quantificar DNA pela intensidade fluorescência e determinar a área dos núcleos celulares
- IV. Verificar o efeito das nanopartículas de prata na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese química das AgNPs

Nanopartículas de prata de 15 nm foram sintetizadas segundo AGNIHOTRI *et al.* (2014), empregando boro-hidreto de sódio (NaBH_4) como redutor primário e citrato trissódico (TSC), tanto como redutor secundário quanto como estabilizante. Os processos de redução foram realizados a duas temperaturas diferentes, isto é, a 60°C e 90°C, mediados predominantemente por boro-hidreto de sódio e citrato trissódico, respectivamente. Os reagentes NaBH_4 a 0,002 M e TSC a 0,002 M foram misturados e aquecidos a 60 °C durante 30 minutos no escuro com agitação vigorosa para assegurar uma solução homogênea. No final de 30 minutos, o volume necessário de solução de AgNO_3 0,00117 M foi adicionado gota a gota à mistura até que fosse observada uma mudança de cor da solução de transparente para amarelada. e, subsequentemente, à temperatura foi elevada para 90°C. À medida que a temperatura atingir os 90°C, o pH da solução foi ajustado para 10,5 utilizando NaOH 0,1 M enquanto o aquecimento continuará durante 20 minutos, até a mudança de cor ficasse mais evidente (mais amarelo), indicando a formação das AgNPs. Para remover os redutores que não reagiram, as suspensões de AgNP foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos). A suspensão de nanopartículas foi deixada esfriando à temperatura ambiente e finalmente armazenadas a 4°C até o uso. O tamanho e morfologia das nanopartículas de prata foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão FEI Tecnai Spirit Biotwin, operando a 80 KV.

4.2 Linhagens celulares e condições de cultivo

Para a avaliação do efeito das AgNPs, as linhagens celulares utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Banco de células do Rio de Janeiro, sendo as linhagens tumorais U87 (glioblastoma humano) e DU-145 (câncer de próstata) e como modelo não tumoral a linhagem HFF-1 (fibroblasto de prepúcio humano) foram utilizadas. As linhagens HFF-1, U87 e DU-145 foram cultivadas em meio de cultivo DMEM high glucose. Para linhagens U87 e DU-145 o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin 10000 U/mL, Gibco). Já para a linhagem HFF-1 o meio foi suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico-antimicótico (100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/ml de anfotericina B) e 1% de L-glutamina (4mM).

Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, até obtenção do percentual de confluência ideal. Após atingirem a confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática tripsina-EDTA em 1%, por 2 a 5 minutos a 37°C. Para a realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas utilizando 10µL do corante Azul de Tripán, em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 1x10³ células/poço, para as linhagens tumorais 1x10⁴ células/poço, para a linhagem não tumoral.

4.3 Curva de Crescimento

A densidade celular estipulada para o uso nos ensaios foi definida através de curvas de crescimento. As curvas de crescimento foram feitas através da técnica de análise alto conteúdo (HCA) (tradução livre do inglês *high-content analysis*), em que células em fase exponencial de crescimento foram plaqueadas em placas pretas de fundo transparente (Costar) de 96 poços nas densidades de 1x10², 1x10³ e 1x10⁴ células/poço, em seguida foram coradas com 1µM Hoechst 33342 (Thermo Fisher - Invitrogen) e analisadas nos tempos 0, 24, 48 e 72h. O sistema de análise celular de alto conteúdo GE IN CellAnalyzer 2000 (GE Health-Care Life Sciences) foi utilizado para gerar automaticamente imagens de fluorescência (objetiva de 10X, λ em Hoechst 461 nm, filtro DAPI, região espectral: 432 ± 48 nm) de 9 campos de cada poço. As análises das imagens adquiridas foram feitas no software GE IN CellAnalyzer1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos (núcleos). Após a segmentação dos objetos, estes foram automaticamente quantificados para estimativa da proliferação celular.

4.4 Avaliação da proliferação celular

Para a análise de proliferação celular, as células HFF-1, U87 e DU-145 em fase exponencial de crescimento foram plaqueadas em placas pretas de fundo transparente de 96 poços (Corning Incorporated Costar®), à uma densidade de 1x10³ células/poço para as linhagens tumorais (U87 e DU-145) e 1x10⁴ células/poço para a linhagem não tumoral (HFF-1) em triplicata com 1µM de Hoechst 33342 (Thermo Fisher - Invitrogen). Após 24h as linhagens foram tratadas com AgNPs em diferentes concentrações (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) e o controle não tratado foi realizado na ausência de nanopartículas de prata. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, o sistema de análise celular de alto conteúdo GE

InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences) foi utilizado para gerar automaticamente imagens de fluorescência (objetiva de 10X, λ em Hoechst 461 nm, filtro DAPI, região espectral: 432 ± 48 nm) de 9 campos aleatórios de cada poço. A contagem de células das imagens adquiridas foi feita no *software* InCell Analyzer 1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos (núcleos). Após a segmentação dos objetos, estes foram automaticamente quantificados para estimativa da proliferação celular. Para o acompanhamento da curva de crescimento, a quantidade de núcleos contados nos controles (não tratados) serão normalizados para 100% e os núcleos contados nos tratados foram convertidos em percentual de proliferação com relação ao controle. Os dados gerados foram usados para gerar gráficos de HCA no *software* GraphPad Prism 8 com o valor das médias do número de células em cada condição experimental.

4.5 Determinação da taxa de crescimento e do tempo de duplicação da população celular

A taxa de crescimento e o tempo de duplicação da população de HFF1, U87 e DU145 foram estimados de acordo com SHERLEY *et al.*, 1995. Em resumo, foi utilizada a fórmula a seguir para o cálculo da taxa de crescimento:

$$N_t = N_0 2^{ft}$$

Onde N_t = número total de células, N_0 = número inicial de células, f = taxa de crescimento e t = tempo de cultivo. A partir dos valores da taxa de crescimento, o tempo de duplicação da população foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$TDDP = \frac{\ln(2)}{f}$$

Onde TDDP = tempo de duplicação da população, \ln = logaritmo natural e f = taxa de crescimento.

4.6 Determinação do IC₅₀ e Índice de seletividade (IS)

O IC₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular) das culturas tratadas de HFF-1, U87 e DU-145 foi determinado através de uma análise de regressão não linear (equação

dose-resposta) no *software* Graphpad Prism 8. O índice de seletividade (SI) foi calculado conforme apresentado na equação: $SI (AgNP) = IC_{50} (\text{linhagem não tumoral}) / IC_{50} (\text{linhagem tumoral})$.

4.7 Quantificação do conteúdo de DNA e área dos núcleos celulares

Para a aquisição das imagens foram realizados os mesmos passos do item 4.4, já as análises das imagens adquiridas, foram feitas no software GE INCell Analyzer1000 workstation (GE Health care Life Sciences), utilizando algoritmos de detecção automática de objetos (núcleos). Após a segmentação dos objetos, estes foram automaticamente quantificados para estimativa da área e intensidade de fluorescência dos núcleos.

4.8 Avaliação da viabilidade celular por MTT

Para avaliar a viabilidade celular após o tratamento com as AgNPs, as células em fase exponencial (HFF-1, U87 e DU-145) foram plaqueadas conforme descrito no item 4.4 e submetidos ao teste de viabilidade pelo método colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]}. Onde após 48h o meio foi retirado e adicionados em cada poço, 110 μL solução de MTT (1000 μL PBS para 10 μL de MTT), em seguida, as células ficaram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 4h. Após o período de incubação, o MTT foi descartado e foram adicionados 50 μL de DMSO (dimetilsulfóxido) para lise celular e solubilização da formazana que foi gerada. Depois de 10 min foi observada uma mudança de cor e sua intensidade foi avaliada pela leitura em espectrofotômetro de UV-Vis a 490 nm e os dados obtidos foram normalizados de acordo com as células não tratadas. O IC_{50} calculado a partir dos valores obtidos nos ensaios de viabilidade, das culturas tratadas de células tumorais e não tumorais foi determinado através do *software* GraphpadPrism 8.

4.9 Avaliação da Viabilidade celular por HCA

A análise de alto conteúdo (HCA) foi utilizada para avaliar o efeito da citotoxicidade das AgNPs. Para o plaqueamento das linhagens e aquisição das imagens foram realizados os mesmos passos do item 4.4. Após 48h de incubação, foram adicionados com a concentração de 5 μM do corante iodeto de propídeo (PI) a cada 10mL de meio DMEM High em cada poço por 15 minutos a 25°C (temperatura ambiente). As imagens foram adquiridas pelo INCell Analyzer 2000 (objetiva de 10X, λ em Hoechst 461 nm, filtro DAPI, região espectral: 432 \pm

48 nm e filtro Texas Red, região espectral: 620 ± 30 nm), e posteriormente foi analisado no software INCell Investigation (GE HealthCare Life Sciences). O controle negativo foi incubado somente com o meio de cultura, e o controle positivo corresponde às células fixadas com paraformaldeído 4% (PF4%), por 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram observados: (a) número de células Hoechst positivas e (b) número de células PI positivas (mortas). Os gráficos dos resultados de HCA foram feitos utilizando as médias dos poços de cada condição experimental.

4.10 Avaliação da produção de ROS

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, as linhagens U87 e DU-145 foram cultivadas conforme item 4.4. Após 48h, e antes do início do ensaio, a integridade da monocamada celular foi verificada em um microscópio óptico invertido. Em seguida, o meio de cultivo foi removido e as células foram lavadas 3x com 200 μ L de PBS. Depois, foram adicionados 200 μ L de solução de dihidroetídio (DHE) a 5 μ M em cada poço, e, em seguida, a placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas novamente 2x com 200 μ L de PBS e adicionado 200 μ L de formaldeído a 4%. Após 20 minutos em temperatura ambiente (25°C), foi realizada outra lavagem com 200 μ L de PBS e as amostras foram armazenadas em igual volume da mesma solução-tampão a 4°C com proteção a luz até a análise por HCA no equipamento INCell Analyzer 2000.

4.11 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando intervalo de confiança de 95% no software GraphPad Prism 8. Os testes estatísticos utilizados foram: Anova one-way ou Anova two-way com pós-teste de Tukey. A significância estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento

As curvas de crescimento das células foram estabelecidas por HCA com a finalidade de determinar a densidade celular para as condições de tratamento dos ensaios a serem realizados. Em placas de 96 poços, foram feitas curvas de crescimento das linhagens não tumorais (HFF-1) e tumorais (U87 e DU-145). As figuras 8 e 9 mostram o crescimento celular nas três diferentes densidades analisadas (10^2 , 10^3 e 10^4). A linhagem HFF-1 apresentou um crescimento baixo nas densidades 10^2 e 10^3 , correspondendo a 5 e 19%, respectivamente. Para a densidade 10^4 o crescimento celular foi de 71,9%, entretanto não foi observada a confluência dos poços, sendo assim a concentração mais indicada para tal linhagem. Já as linhagens tumorais U87 e DU-145 apresentaram comportamento semelhante onde o número de células na densidade 10^4 foi de 92,54 e 94,2%, respectivamente, chegando à condição de confluência em 48h. O que não é o ideal, pois caso a quantidade de células na placa de cultivo celular exceda o limite de confluência adequado, não haverá o crescimento normal da monocamada e, conseqüentemente, as células entrarão em seguida na fase de morte, devido à falta de nutrientes e condições de vida necessários (ALVES; GUIMARAES, 2019). Além disso, de acordo com o manual do equipamento de HCA, InCell Analyzer 2000, o ideal para as análises é de confluência máxima de 80%. Isso significa que durante o período de análises para garantir uma segmentação correta, as células não podem ultrapassar 80% de confluência. Caso essa confluência ultrapasse de 80%, a segmentação será prejudicada, causando erros nas análises do equipamento de HCA. Sendo assim a densidade indicada para o plaqueamento de U87 e DU-145 foi de 10^3 células/poço. De acordo com a análise HCA, as concentrações escolhidas possuíam uma condição de ~80% confluência, reforçando que tais concentrações são as mais indicadas para o plaqueamento (Figuras 8 e 9).

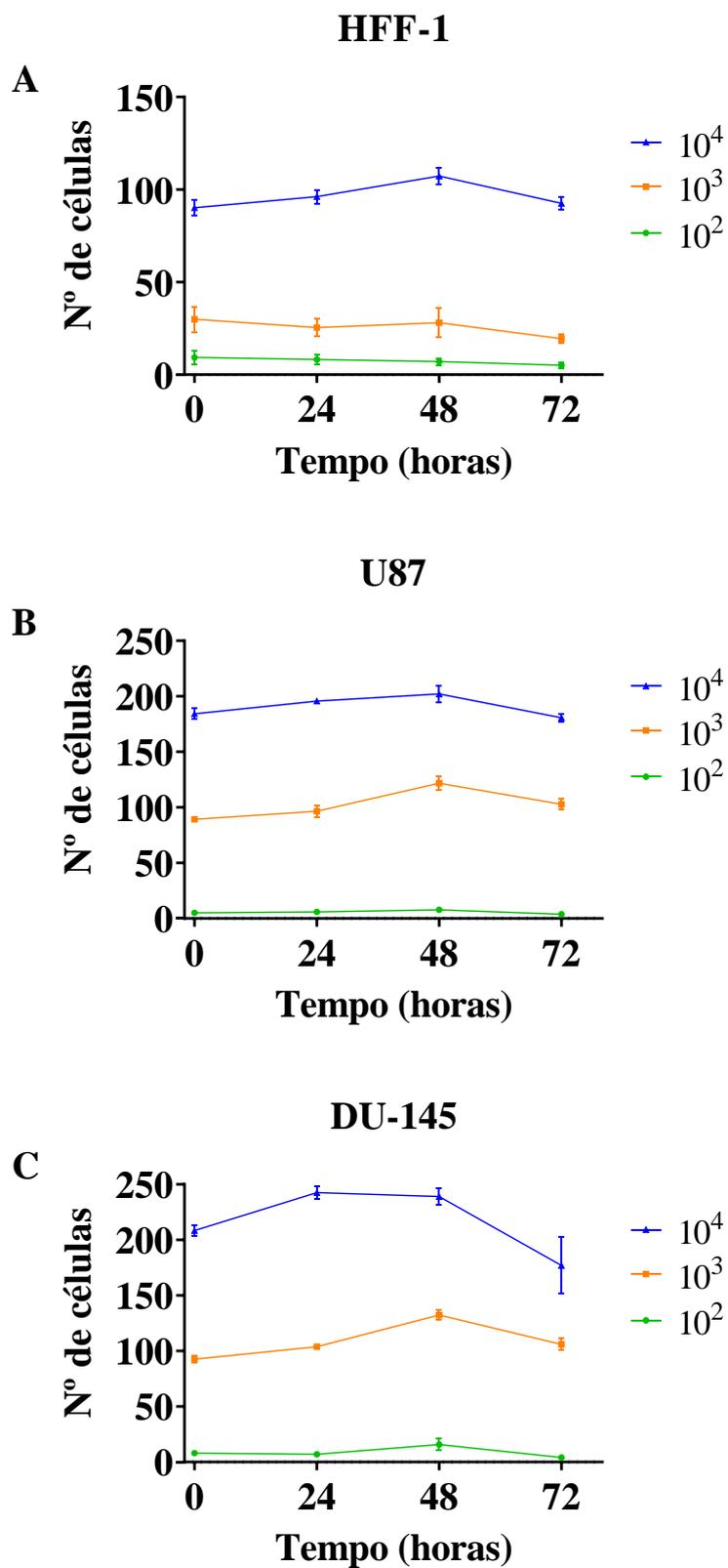
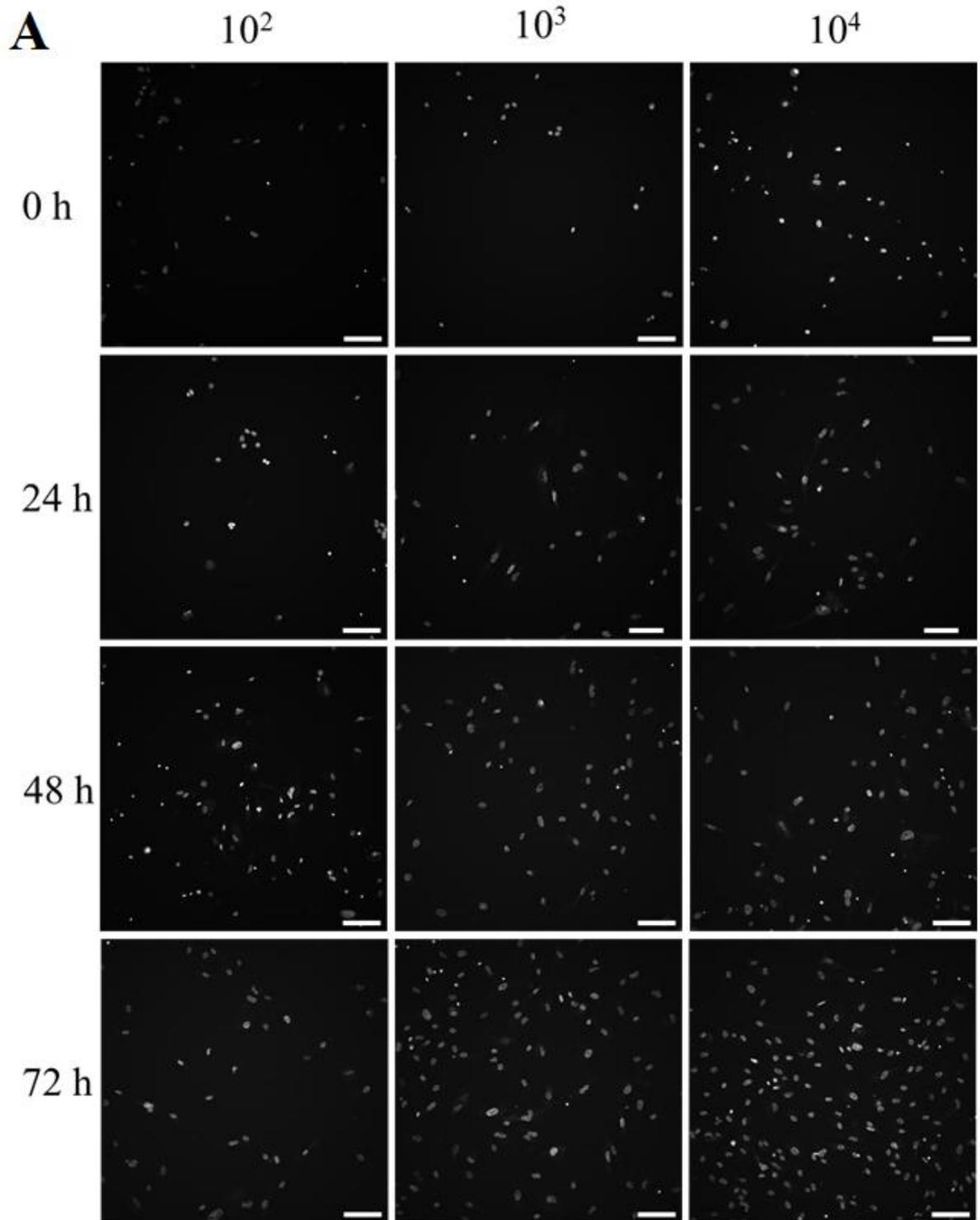
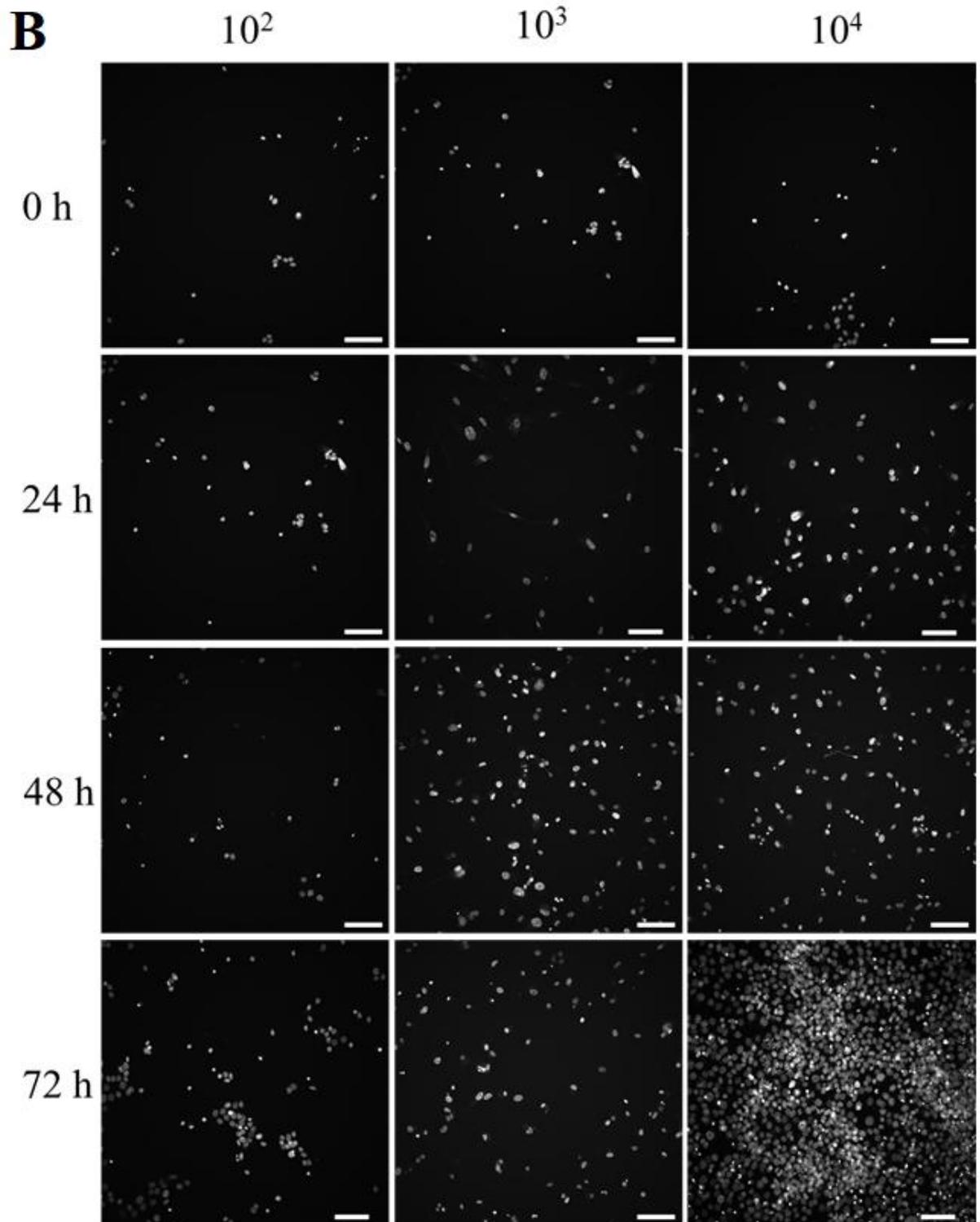


Figura 8: Curvas de crescimento com concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 de células tumorais (U87 e DU-145) e não tumorais (HFF-1). (A) HFF-1 cultivadas por 72h em concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 . (B) U87 cultivadas por 72h em concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 . (C) DU-145 cultivadas por 72h em concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 .

HFF-1



U87



DU-145

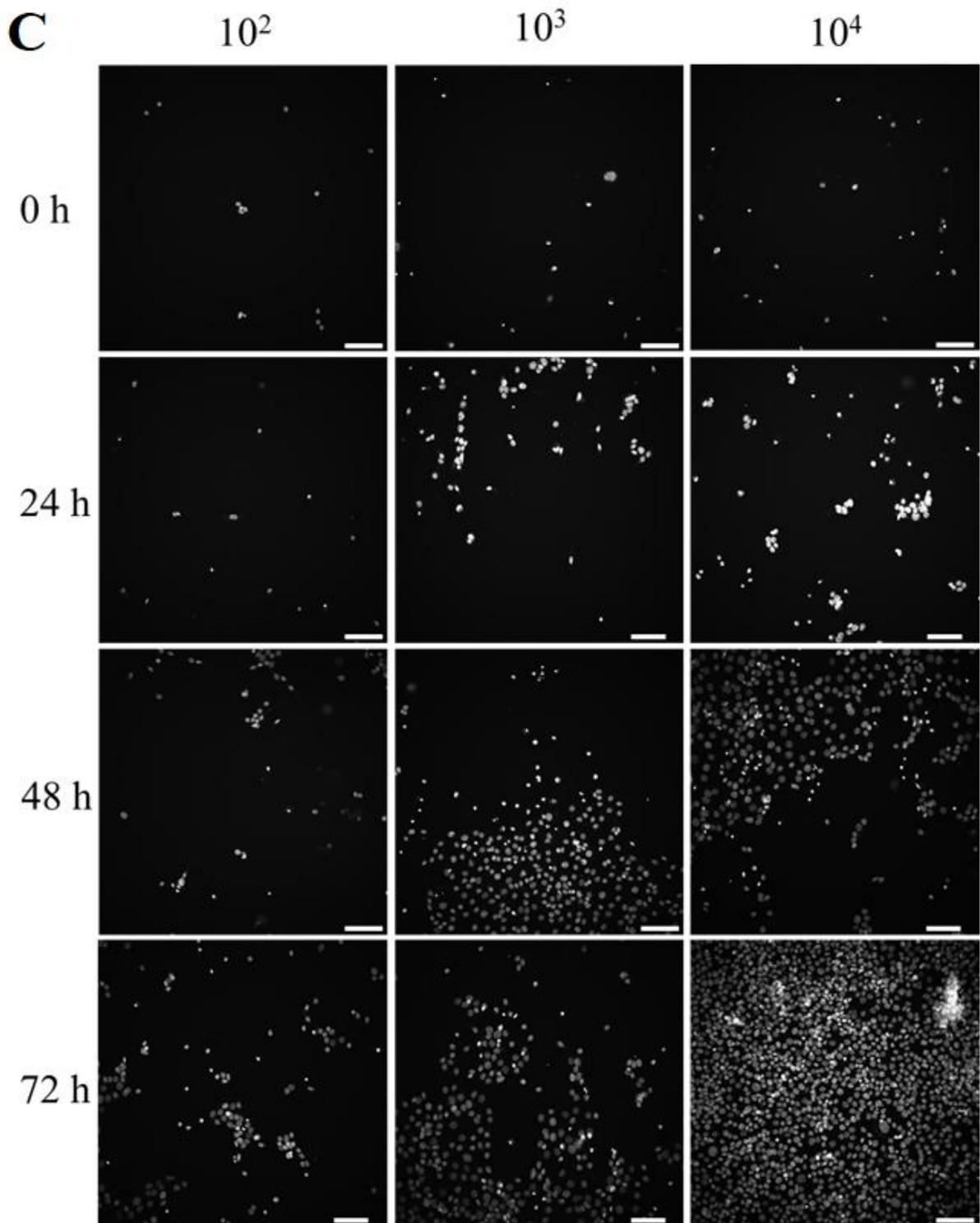


Figura 9: Imagens representativas das curvas de crescimento das linhagens tumorais e não tumorais. (A) HFF-1, (B) U87 e (C) DU-145, com concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 . As barras de escala equivalem a $70 \mu\text{m}$.

5.2 Proliferação celular

Para avaliar se as AgNPs prejudicam o crescimento celular das linhagens HFF-1, U87 e DU-145. Utilizou-se o método HCA para a contagem do número de células através da contagem automática do núcleo celular de células tratadas e não tratadas, pela coloração específica do DNA com corante fluorescente Hoechst 33342, a partir das imagens digitais obtidas no equipamento *IN Cell Analyzer 2000*.

Para este ensaio, as células tumorais e não tumorais foram cultivadas na presença de AgNPs nas concentrações entre 1,56 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 0, 24, 48 e 72h. Os dados de cada condição experimental foram expressos como a porcentagem de proliferação celular em relação ao número de células contadas. As Figuras 10 e 11 e a Tabela 1 demonstram a proliferação celular das três linhagens após 72h de tratamento com AgNPs.

As células da linhagem não tumoral (HFF-1) não sofreram redução estatisticamente significativa no crescimento celular ao longo do tratamento com as nanopartículas em nenhuma das concentrações estudadas (Figuras 10, 11A e Tabela 1). Foi possível observar que em relação a linhagem HFF-1 os percentuais de proliferação mantiveram um padrão semelhante ao controle com as diferentes concentrações de NPs utilizadas e em todos os tempos de tratamento, apresentando uma redução da proliferação somente na concentração mais alta (100 $\mu\text{g/mL}$) em 24h, diminuindo 16,50% em relação as células não tratadas.

Diferentemente da linhagem não tumoral, os dados de proliferação relativos às células U87 (Figura 10, 11B, Tabela 1) mostraram que essa linhagem tumoral quando tratada com as AgNPs obtiveram um efeito antiproliferativo significativo a partir de 24h de interação nas concentrações de 12,5 à 100 $\mu\text{g/mL}$. De modo que os grupos tratados com 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs apresentam reduções de 24,41%, 36,39%, 61,40% e 59,37% no número de células, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. Outro fator observado foi a indução de um leve aumento da proliferação nas concentrações de 3,125 (21,64%) e 6,25 (23,19%) $\mu\text{g/mL}$, quando cultivadas por 48h. Por outro lado, a proliferação diminuiu a partir da concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$ até a mais alta (100 $\mu\text{g/mL}$), em que os grupos tratados com 12,5; 25; 50 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs apresentaram percentual de redução de 34,80%, 80,04% e 71,75%, respectivamente, em 48h e 62,31%, 85,36% e 82,35% em 72h de tratamento. O maior efeito inibitório foi observado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, alcançando 87,21% de inibição após 48h e 89,30% após 72h.

Os dados relativos à interação com a linhagem DU-145 (Figura 10, 11C e Tabela 1), mostram o tratamento com AgNPs após 24h induzindo um aumento de 27,59% da proliferação na concentração 6,25 µg/mL. A diminuição da proliferação foi observada a partir da concentração 12,5 µg/mL até chegar na concentração de 100 µg/mL, tendo um efeito inibitório mais elevado na concentração de 100 µg/mL, alcançando 54,02% de inibição. Após 48h a proliferação das células DU-145 seguiu o mesmo padrão, houve um aumento da proliferação celular nas concentrações mais baixas de 1,56; 3,125 e 6,25 µg/mL, com valores de aumento de 25,77%, 35,18% e 40,65%, respectivamente, e diminuindo o número de células a partir de 12,5 µg/mL, de modo que os grupos tratados 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL de AgNPs apresentam reduções de 9,63%, 18,08%, 29,82% e 48,86% no número de células, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. No tempo final de tratamento (72h) dessas células, a partir da concentração de 6,25 µg/mL os valores de proliferação decrescem progressivamente com valores de inibição de 53,56% para a concentração 25 µg/mL, 64,93% para a concentração de 50 µg/mL e 76,74% para a concentração de 100 µg/mL.

Tabela 1 – Percentual de inibição das linhagens HFF-1, U87 e DU-145 diante do tratamento com diferentes concentrações de AgNPs em diferentes tempos.

Inibição da proliferação celular relativo ao controle (%) em HFF-1, U87 e DU-145									
Tratamento (µg/mL)	HFF1			U87			DU145		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1,56	4,70	0,50	<u>+3,50</u>	12,63	3,99	8,20	8,05	<u>+25,77</u>	2,47
3,125	4,40	2,40	0,00	10,45	<u>+21,64</u>	<u>+9,35</u>	<u>+8,74</u>	<u>+35,18</u>	11,84
6,25	7,50	6,10	4,80	<u>+11,17</u>	<u>+23,19</u>	<u>+7,23</u>	<u>+27,59</u>	<u>+40,65</u>	18,12
12,5	5,00	<u>+1,10</u>	<u>+5,80</u>	24,41	34,80	62,31	22,30	9,63	32,93
25	10,50	4,70	1,80	36,39	80,04	85,36	36,09	18,08	53,56
50	7,30	4,40	0,30	61,40	71,75	82,35	40,00	29,82	64,93
100	16,50	9,90	7,50	59,37	87,21	89,30	54,02	48,86	76,74

Os pontos sublinhados na tabela indicam que as células proliferaram em um nível superior ao do controle.

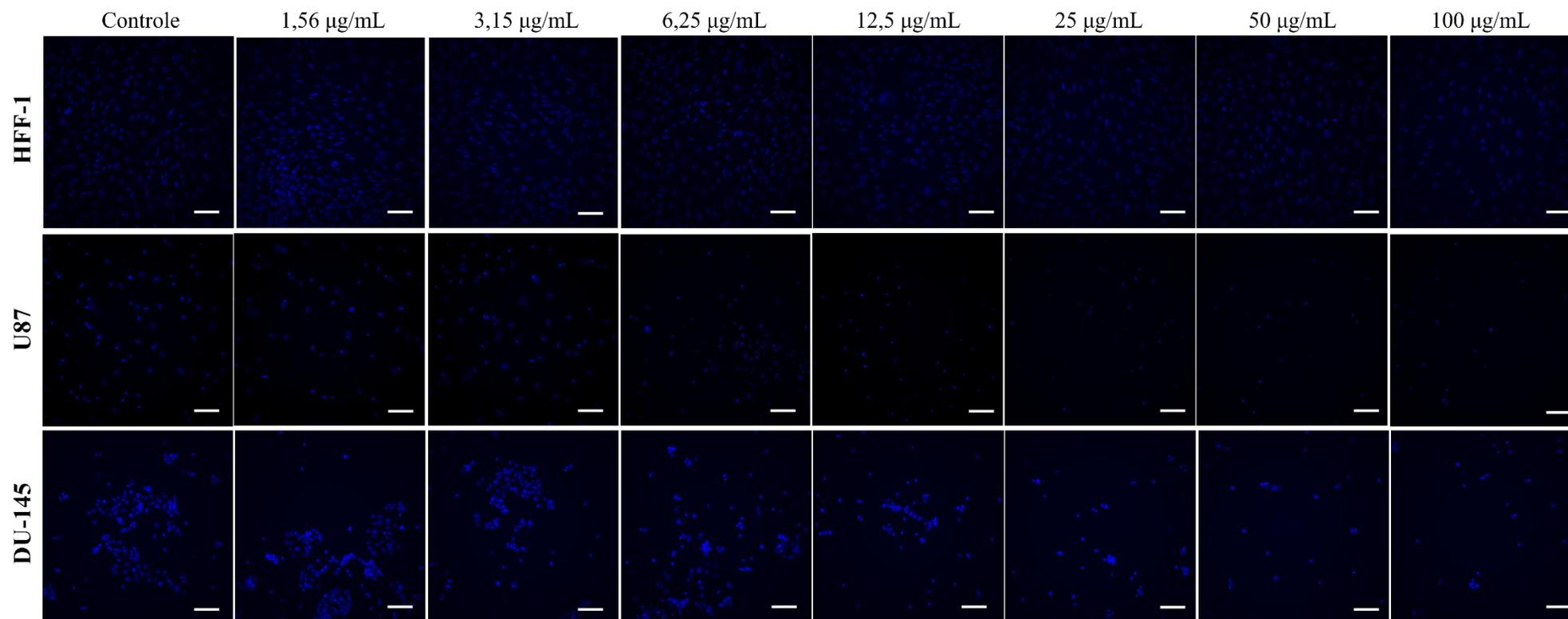


Figura 10: Imagens representativas do ensaio de proliferação humanas tumorais (U87 e DU-145) e não tumorais (HFF-1). As imagens mostram os núcleos das células após 72h de tratamento com concentrações entre 1,56 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs marcados com o corante fluorescente Hoechst. As barras de escala equivalem a 70 μm .

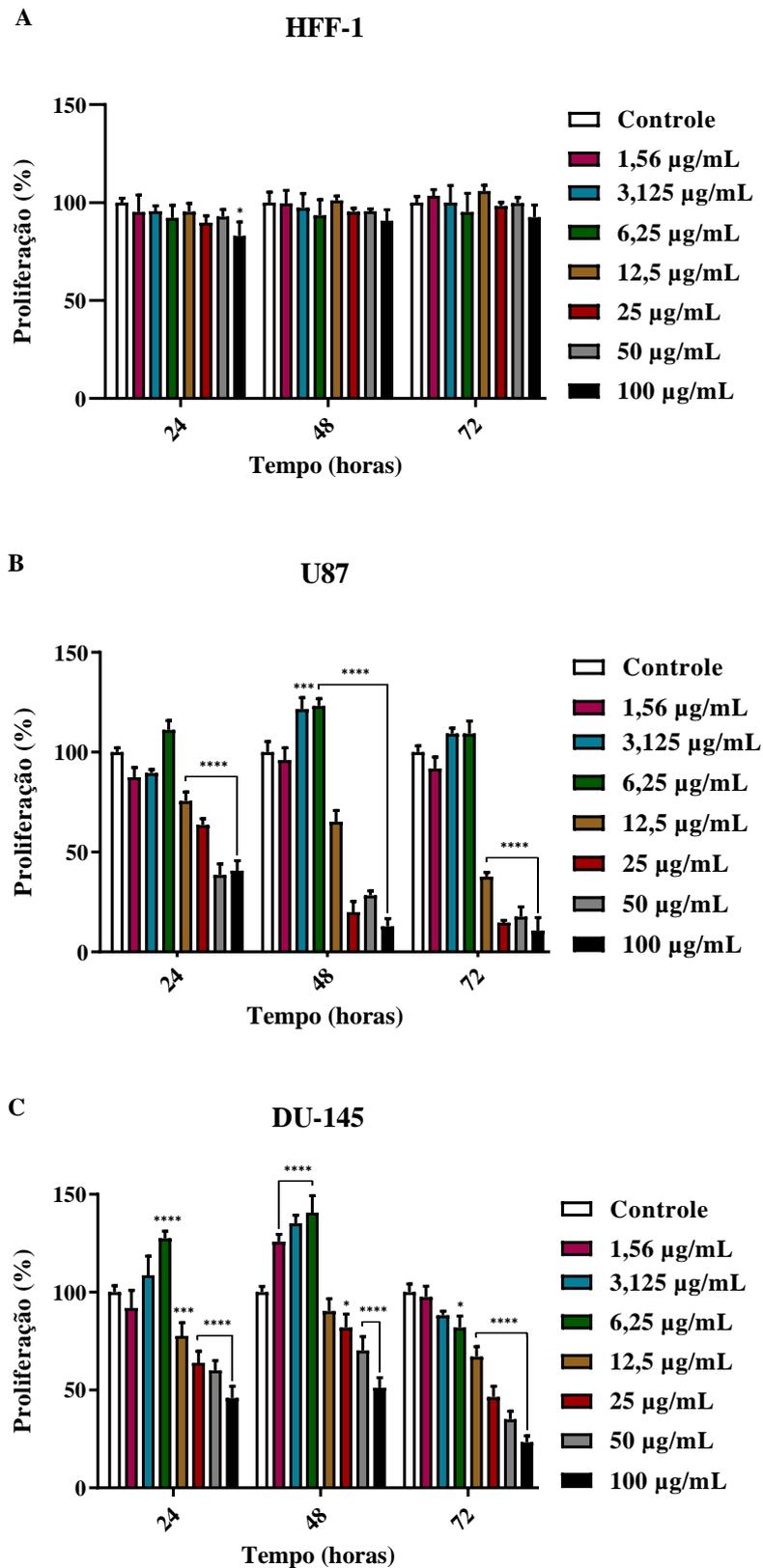


Figura 11: Ensaio de proliferação de células humanas tumorais e não tumorais após tratamento com AgNPs. As linhagens (A) HFF-1, (B) U87 e (C) DU-145 foram cultivadas por 24, 48 e 72h com 1,56 - 100 µg/mL de AgNPs. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001 (Anova Two-way).

5.3 Taxa de crescimento e tempo de duplicação

Para compreendermos melhor o efeito dos tratamentos com as AgNPs sobre o perfil da proliferação de cada tipo celular (não tumorais e tumorais) foi realizada a quantificação da capacidade proliferativa das células tratadas e não tratadas. Para isso, determinou-se as taxas de crescimento (Figura 12, Tabela 2), que representam o número de vezes que as células se duplicam em um dia e o tempo de duplicação da população (Tabela 3), que revela o tempo necessário para dobrar o número de células no cultivo, ambos estabelecidos após 72h de incubação.

Os resultados revelaram que a linhagem HFF-1 quando tratada com AgNPs apresentou taxas de crescimento constante em todas as concentrações quando comparada ao controle (Figura 12A e Tabela 2). Em contraste, para as células U87, a taxa de crescimento diminuiu para ~16%, ~32%, ~29% e ~38%, após o tratamento com 12,5; 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs, respectivamente (Figura 12B e Tabela 2). A linhagem DU-145 quando tratadas com as AgNPs apresentaram diminuição progressiva da taxa de crescimento de acordo com o aumento das concentrações. No entanto, essas reduções foram significativas a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, com reduções de ~6% em 12,5, ~13% em 25 $\mu\text{g/mL}$, chegando a ~18% e ~26%, com o uso das concentrações mais altas de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12C e Tabela 2).

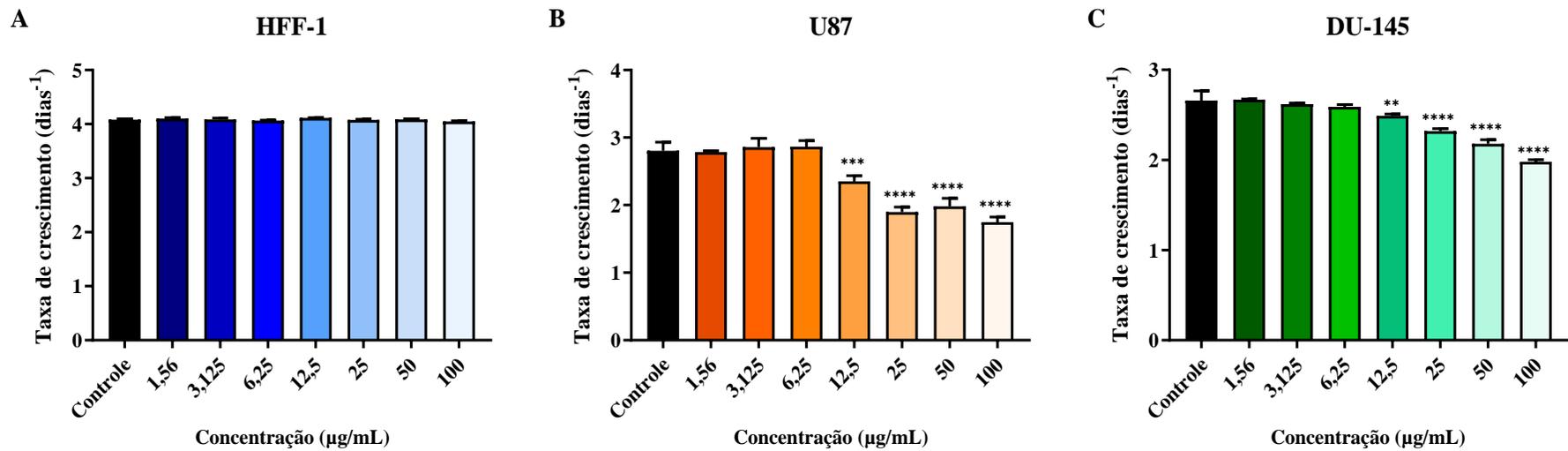


Figura 12: Taxa de crescimento das linhagens HFF-1, U87 e DU-145. (A) HFF-1 cultivadas por 72h com AgNPs. (B) U87 cultivadas por 72h com AgNPs. (C) DU-145 cultivadas por 72h com AgNPs O₃. (D) U87 cultivadas por 72h com AgNPs. Todas as linhagens foram tratadas com concentrações entre 0 e 100µg/mL. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, **** P <0,0001 (Anova One-way).

Tabela 2 – Taxa de crescimento (*f*) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com AgNPs.

Tratamento (µg/mL)	HFF-1	U87	DU-145
Controle	4,08	2,81	2,66
1,56	4,10	2,78	2,67
3,125	4,09	2,86	2,62
6,25	4,06	2,86	2,59
12,5	4,11	2,35	2,49
25	4,08	1,90	2,32
50	4,08	1,98	2,18
100	4,05	1,75	1,98

Como descrito na Tabela 3, em relação ao tempo de duplicação a linhagem não tumoral HFF-1 não teve o tempo de duplicação afetado pelos tratamentos com AgNPs e se manteve constante durante todo o tratamento. Por sua vez, os tempos de duplicação para a célula tumoral U87 diminuíram levemente (~2%) para as concentrações de 3,125 e 6,25 µg/mL e aumentaram ~19% para a concentração de 12,5 µg/mL. O tempo de duplicação aumentou cerca de 48% e 41% nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente, e chegou a ser aproximadamente 60% maior na concentração de 100 µg/mL em relação ao controle.

O TDDP de DU-145 quando tratado com até 6,25 µg/mL de AgNPs não apresentou alterações significativas. Porém, na concentração de 12,5 µg/mL foi ligeiramente maior (~7%) em relação as células não tratadas, enquanto o tratamento com 25, 50 e 100 µg/ml aumentou em ~15, ~22 e ~34%, respectivamente.

Tabela 3 – Tempo de duplicação (TDDP) de células humanas tumorais e não tumorais tratadas com AgNPs em horas.

Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	HFF-1	U87	DU-145
Controle	4,08	5,95	6,26
1,56	4,05	5,97	6,22
3,125	4,07	5,83	6,34
6,25	4,09	5,81	6,43
12,5	4,04	7,08	6,68
25	4,08	8,77	7,19
50	4,07	8,41	7,63
100	4,11	9,54	8,39

5.4 Eficácia dos tratamentos com AgNPs a partir da determinação do IC_{50}

Com base nos dados obtidos no ensaio de proliferação realizados através da HCA, foram calculados os valores de IC_{50} para cada uma das linhagens celulares (HFF-1, U87 e DU-145). Como o IC_{50} representa a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular, quanto menor for o valor do IC_{50} , mais sensíveis são as linhagens ao tratamento com AgNPs. Sendo assim, os dados do IC_{50} mostrados na Tabela 4, são considerados um parâmetro indicativo de eficácia de tratamentos com NPs (HOLMES *et al.*, 2015; RAO & BOOMINATHAN, 2016).

Tabela 4 - IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) calculado de acordo com cada tratamento em HFF-1, U87 e DU-145.

Tempo (h)	IC_{50} HFF-1	IC_{50} U87	IC_{50} DU-145
24	ND	46,04	75,53
48	ND	16,97	96,56
72	ND	12,16	26,19

ND = não determinado

Os valores de IC₅₀ para HFF-1 em 24h, 48 e 72h não puderam ser determinados devido ao número final de células contadas após os tratamentos terem sido semelhantes ao número inicial de células do controle, não havendo inibição de 50% da proliferação celular, sendo representados por ND (não determinado). O IC₅₀ dos tratamentos em 24h para U87 foi de 46,04 µg/mL e para DU-145 foi de 75,53 µg/mL. Os demais valores de IC₅₀ obtidos através dos ensaios de proliferação para a linhagem U87 tratadas com as AgNPs, foram de 16,97 e 12,16 µg/mL em 48 e 72h respectivamente. Já a linhagem DU145 obteve em 48 e 72h os valores respectivos de 96,56 e 26,19 µg/mL.

5.5 Quantificação do conteúdo de DNA e área dos núcleos celulares

A fim de verificar se as AgNPs afetaram a área nuclear e causaram a degradação do DNA as linhagens tratadas e não tratadas foram analisadas por HCA. Esse método é utilizado para uma quantificação indireta do conteúdo de DNA por fluorescência (ANGUISSOLA *et al.*, 2014). Os dados referentes à área do núcleo e intensidade de fluorescência do sinal de DNA através do marcador DNA Hoechst foram calculados automaticamente pelo software de análise utilizado na segmentação dos núcleos. A Figura 13 mostra os dados de área e fluorescência nuclear da linhagem não tumoral e das linhagens tumorais tratadas com AgNPs.

A linhagem HFF-1 quando tratada com AgNPs não sofreu modificações na área nuclear em nenhuma das concentrações utilizadas quando comparadas ao controle (Figura 13A). A linhagem U87 quando tratada por 24h sofreu redução significativa somente na maior concentração utilizada (100 µg/mL). Entretanto, quando tratadas em 48 e 72h apresentaram reduções em todas as concentrações, chegando a uma redução maior na concentração de 100 µg/mL cerca 44% e 63% menor (em 48 e 72h respectivamente) quando comparada ao grupo controle (Figura 13C). A linhagem DU-145 apresentou comportamento semelhante a U87 em relação a área dos núcleos, em 24h obteve diferenças significativas de redução em relação as células não tratadas somente nas maiores concentrações (25, 50 e 100 µg/mL). No entanto, apresentou reduções em todas concentrações a partir de 48h, sendo a maior redução de ~35% em 48h e ~58% em 72h de tratamento com a contração de 100 µg/mL (Figura 13E).

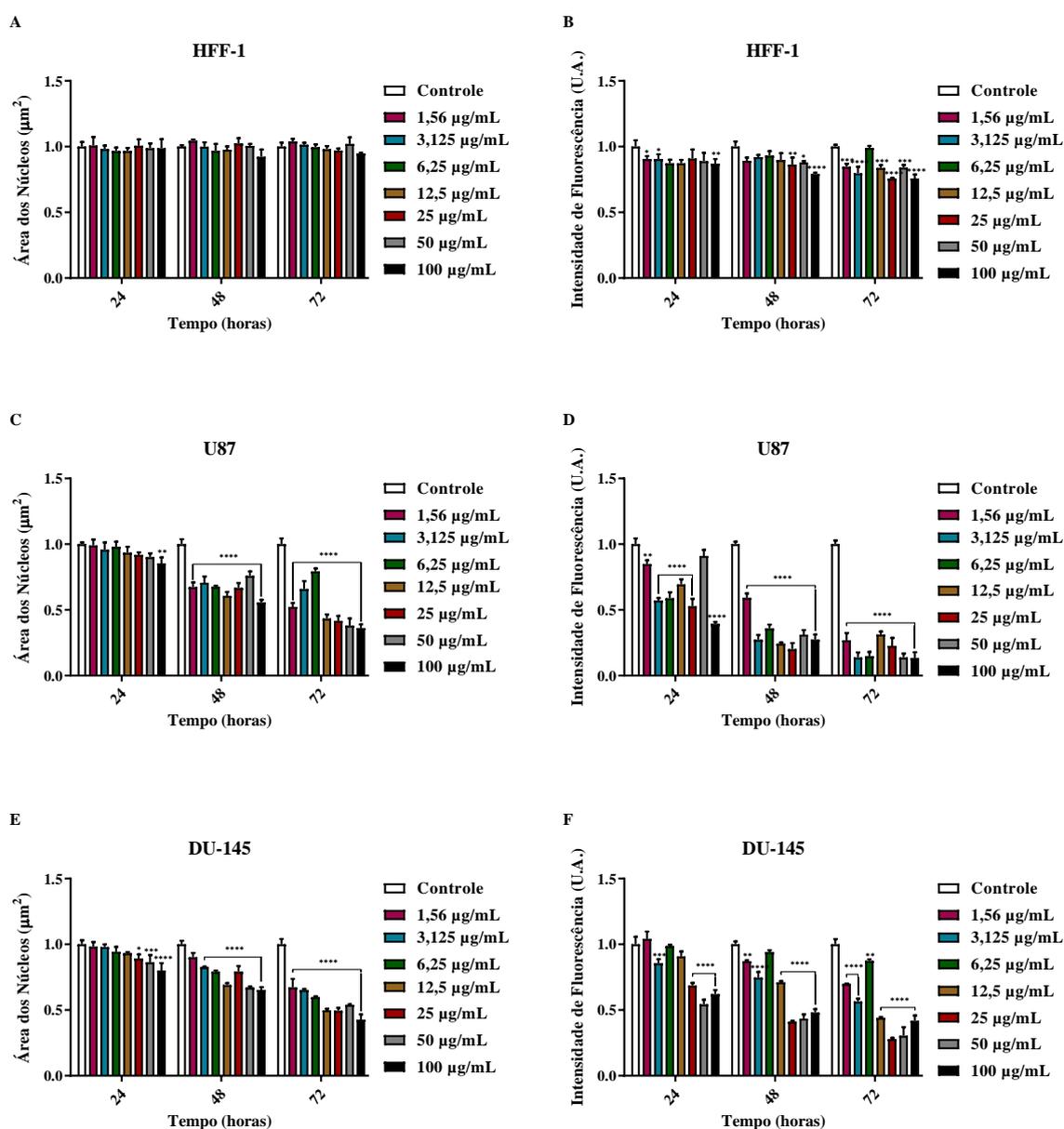


Figura 13: Área e intensidade de fluorescência nuclear das linhagens HFF-1, U87 e DU-145. (A) e (B) HFF-1 cultivadas por 72h com AgNPs. (C) e (D) U87 cultivadas por 72h com AgNPs. (E) e (F) DU-145 cultivadas por 72h com AgNPs. Todas as linhagens foram tratadas com concentrações entre 1,56 e 100µg/mL. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001 (Anova Two-way).

O gráfico referente à intensidade de fluorescência do núcleo mostra que a célula HFF-1 (Figura 13B) apresentou pouca redução em todas concentrações testadas após 72h de tratamento em relação ao controle, sendo a maior redução observada nos tratamentos com 25 e 100 µg/mL (~24% menor). A linhagem U87 (Figura 13D) sofreu grandes reduções na fluorescência em todas as concentrações após o tratamento, alcançando reduções mais altas de

aproximadamente 61% com 100 µg/mL em 24h, 80% com 25 µg/mL em 48h e 87% com 3,125; 6,25; 50 e 100 µg/mL em 72h. O gráfico referente a linhagem DU-145 (Figura 13F) também mostra reduções na intensidade de fluorescência dos núcleos em todas as concentrações testadas, no entanto, os valores oscilam em função da concentração, apresentando uma maior redução em ~46% com 50 µg/mL em 48h, ~59% com 25 µg/mL em 48h e ~72% com 25 µg/mL em 72h.

5.6 Viabilidade celular por MTT

A relação da concentração de AgNPs com a viabilidade das células utilizadas foi avaliada por meio da técnica colorimétrica MTT com o auxílio de um espectrofotômetro. Os resultados demonstraram que a viabilidade celular da linhagem não tumoral HFF-1 (Figura 14A) se manteve próxima ao grupo controle quando cultivada nas concentrações de 1,56 a 25 µg/mL. No entanto, apresentaram um percentual de viabilidade menor no tratamento com as concentrações de 50 e 100 µg/mL, com reduções de 18% e 30%, respectivamente, em relação as células não tratadas. A linhagem U87 apresentou viabilidade celular (Figura 14B) sem alterações quando tratada com as concentrações de 1,56 µg/mL de AgNPs. Diferentemente de HFF-1, a viabilidade celular de U87 foi reduzida de forma decrescente com o aumento das concentrações utilizadas, apresentando percentual de células viáveis de 19%, 22%, 60%, 65%, 76% e 79% menor em relação ao controle quando estas células foram tratadas com as concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL de AgNPs, respectivamente. O tratamento de DU-145 com as nanopartículas também manteve percentual de viabilidade similar ao controle nos tratamentos com as concentrações de 1,56 e 3,125 µg/mL. No entanto, proporcionou significativo aumento do percentual de células viáveis de DU-145 quando comparada ao controle: 25%, porém, apenas na concentração de 6,25 µg/mL (Figura 14C). Em contrapartida, as células da linhagem sofreram reduções significativas, em relação ao controle, em todas as concentrações após o tratamento tanto com AgNPs a partir de 12,5 µg/mL. A redução na viabilidade em relação ao grupo controle chegou a 25% para as células tratadas com 12,5 µg/mL, 39% para tratadas com 25 µg/mL, 75% para as células tratadas 50 µg/mL e 63% para o tratamento com 100 µg/mL de nanopartículas. Os resultados demonstraram que a linhagem U87 foi a que apresentou o maior efeito de redução na viabilidade celular ao ser tratada com AgNPs.

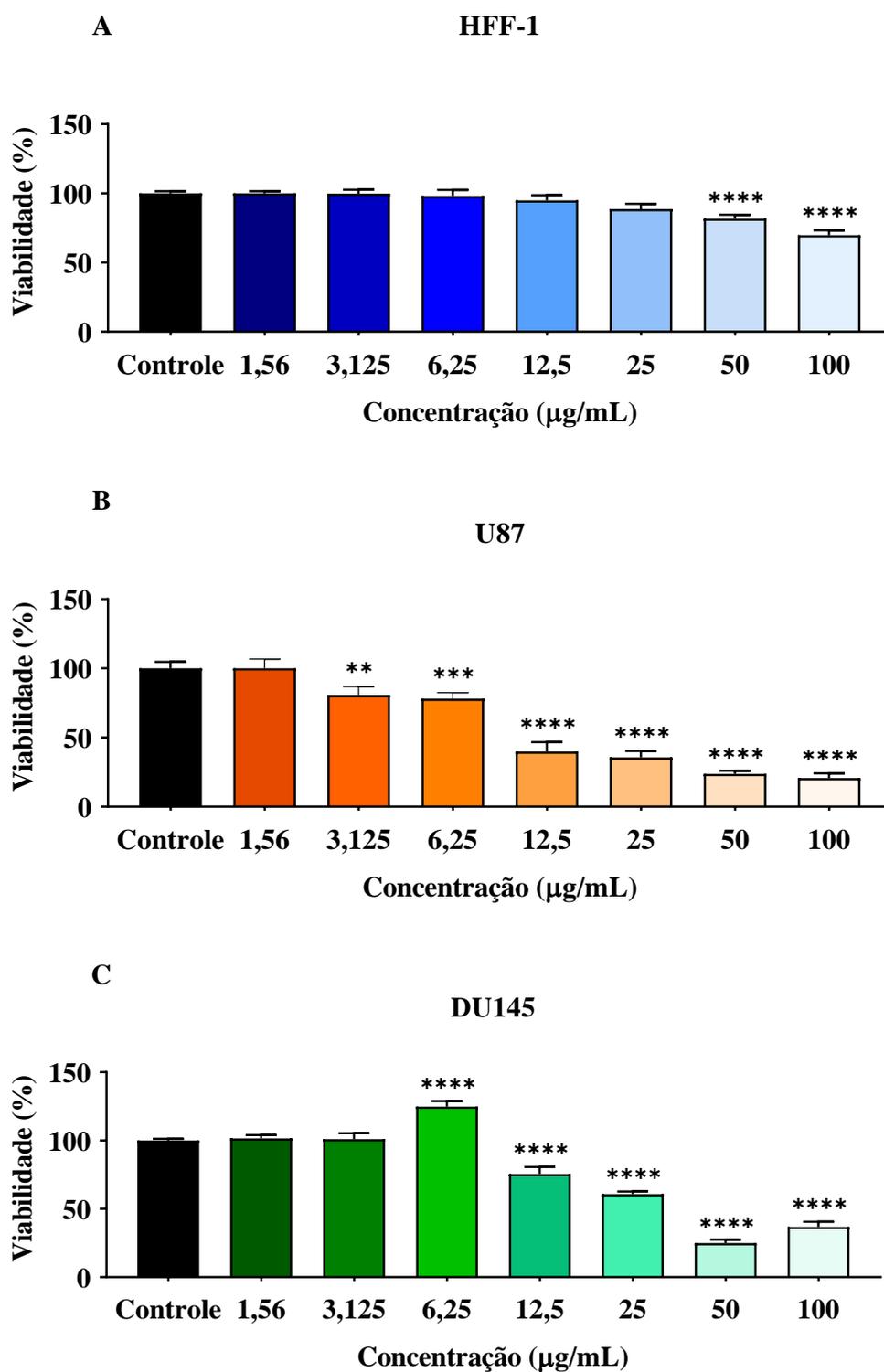


Figura 14: Ensaio de viabilidade por MTT de células humanas tumorais e não tumorais. (A) HFF-1 cultivadas por 48h com as AgNPs. (B) U87 cultivadas por 48h com as AgNPs. (C) DU-145 cultivadas por 48h com as AgNPs. Todas as linhagens foram tratadas com concentrações entre 1,56 e 100µg/mL. * P <0,05, ** P <0,01, * P <0,001, **** P <0,0001 (Anova One-way).**

5.7 IC₅₀ e índice de seletividade dos ensaios de viabilidade

Através dos valores da viabilidade avaliada por MTT foi possível calcular valores de IC₅₀ para as linhagens HFF-1, U87 e DU-145. O IC₅₀ calculado para a linhagem HFF-1, tratada com as AgNPs obtido foi de 233,70 µg/mL, a linhagem U87 apresentou no valor de IC₅₀ de 14,30 µg/mL e a linhagem DU-145 obteve valor de IC₅₀ de 35,67 µg/mL (Figura 15).

Com os dados obtidos através do cálculo de IC₅₀, foi medido o índice de seletividade (IS) do tratamento e o valor obtido para U87 foi de 15,27 e para DU-145 o índice de 6,55 (Tabela 5). Mostrando que a concentração necessária para impedir o crescimento das células U87 e DU-145 é 16,34 e 6,55, respectivamente, vezes menor do que a correspondente para causar o mesmo efeito nas células não tumorais (HFF-1). Os resultados obtidos (IS>1) indicam um tratamento seletivo.

Tabela 5: IC₅₀ e Índice de Seletividade (IS) calculado de acordo com a viabilidade realizada através da análise de MTT em HFF-1, U87 e DU-145 após o tratamento com AgNPs.

Células	IC₅₀	IS
HFF-1	233,70	-
U87	14,30	16,34
DU-145	35,67	6,55

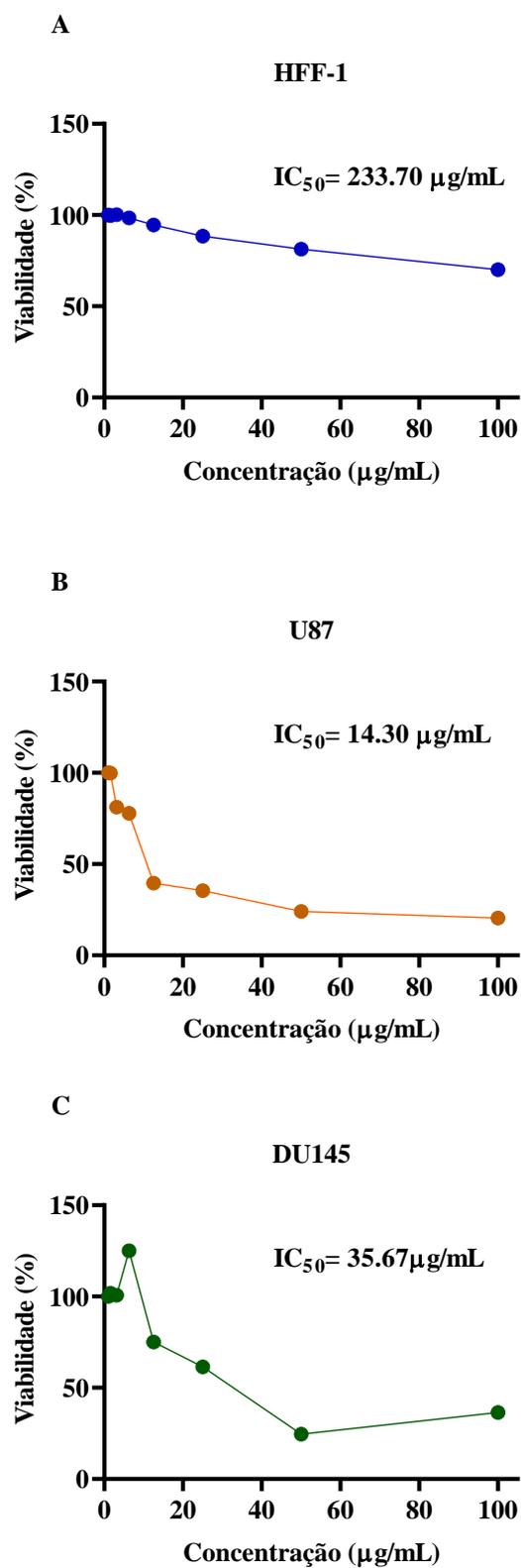


Figura 15: IC₅₀ calculado de acordo com o ensaio de MTT nas linhagens tumorais e não tumorais. (A) HFF-1, (B) U87 e (C) DU-145 cultivadas por 48h com concentrações entre 1,56 e 100 µg/mL de AgNPs.

5.8 Viabilidade celular por HCA

A viabilidade celular também foi determinada por HCA com a utilização do iodeto de propídio (PI). Como pode ser observado na Figura 16A, a linhagem não tumoral HFF-1 quando tratada com AgNPs por 48h, sofreu redução da viabilidade apenas na concentração de 100 µg/mL (20%). A linhagem U87 (Figura 16B) sofreu reduções significativas na viabilidade nas concentrações a partir de 12,5 µg/mL, apresentando um percentual de redução de 21,1% em 12,5 µg/mL, 25,3% em 25 µg/mL, 18,4% em 50 µg/mL e a maior redução de 30% na concentração 100 µg/mL. Na linhagem DU-145 também não se observou perdas significativas da viabilidade no tratamento com as concentrações de 1,56, 3,125 e 6,25 µg/mL. No entanto, houve redução no tratamento com as concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL, sendo 31,0; 30,9, 41,1 e 52,1%, respectivamente (Figura 16C).

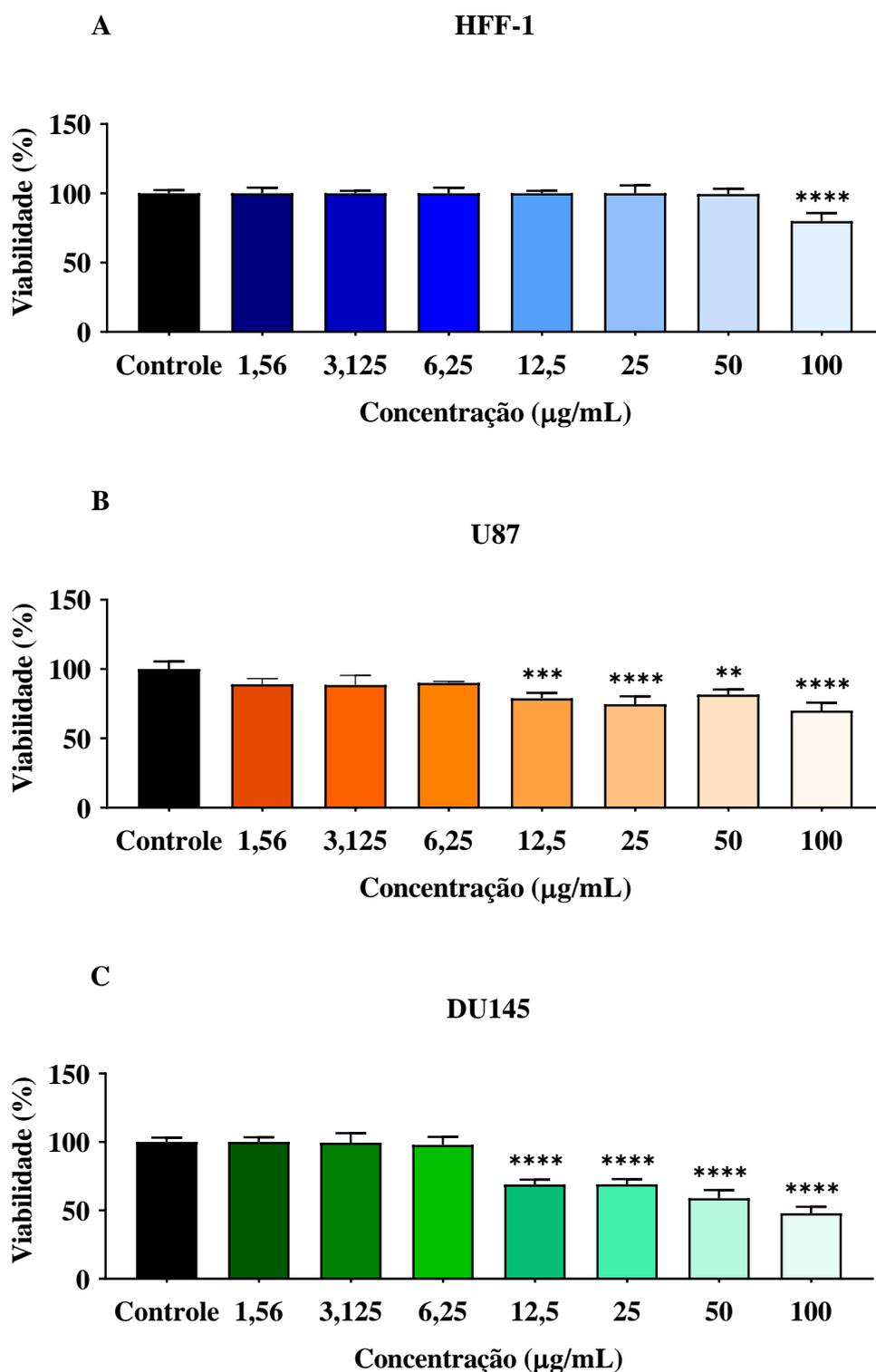


Figura 16: Ensaio de viabilidade por HCA de células humanas tumorais e não tumorais. (A) HFF-1 cultivadas por 48h com as AgNPs. (B) U87 cultivadas por 48h com as AgNPs. (C) DU-145 cultivadas por 48h com as AgNPs. Todas as linhagens foram tratadas com concentrações entre 1,56 e 100µg/mL. * P <0,05, ** P <0,01, * P <0,001, **** P <0,0001 (Anova One-way).**

5.9 Produção de ROS

Para avaliar se as nanopartículas de prata induzem alguma alteração na produção de ROS, as células receberam tratamento com AgNPs na concentração de IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} para as linhagens HFF-1 ($IC_{25} = 116,85 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 233,70 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{75} = 350,55 \mu\text{g/mL}$) e U87 ($IC_{25} = 7,15 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 14,30 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{75} = 21,45 \mu\text{g/mL}$) e marcadas com DHE, após 48h foram analisadas por HCA. Os resultados mostram que em ambas as células a produção de ROS não sofreram alterações significativas e mantiveram um percentual próximo ao controle (Figuras 17 e 18).

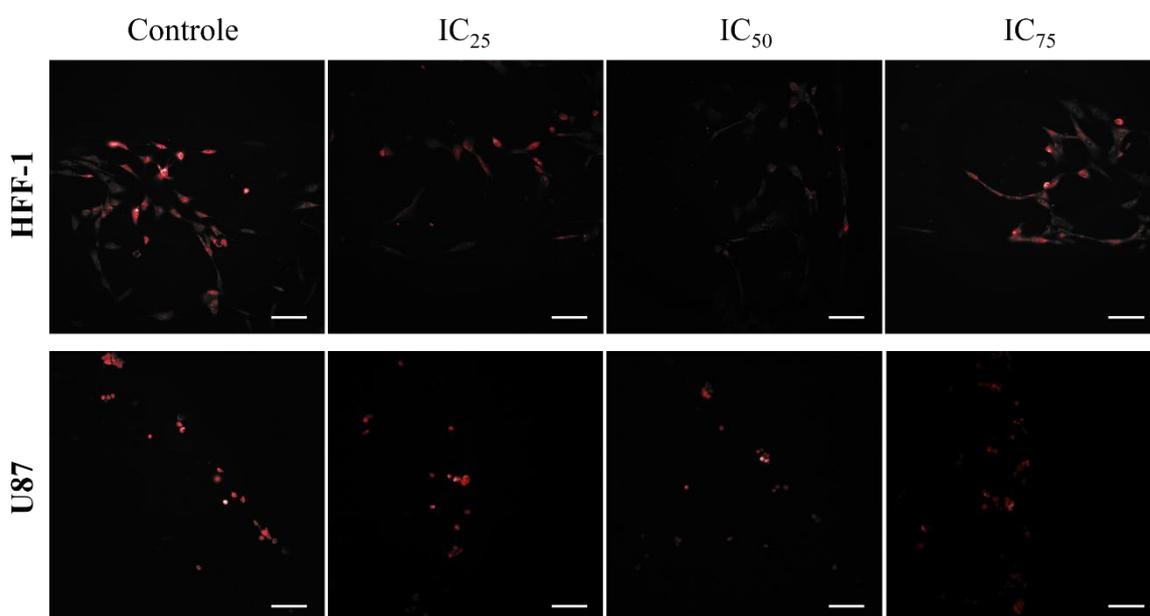


Figura 17: Imagens representativas da análise da produção de ROS em linhagens celulares tumorais e não tumorais. As linhagens (A) HFF-1 e (B) U87 cultivadas por 48h com concentrações de IC_{25} , IC_{50} e IC_{75} de AgNPs. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de células submetidas a ensaio com dihidroetídio (DHE) após interação com as AgNPs. As barras de escala equivalem a $70 \mu\text{m}$.

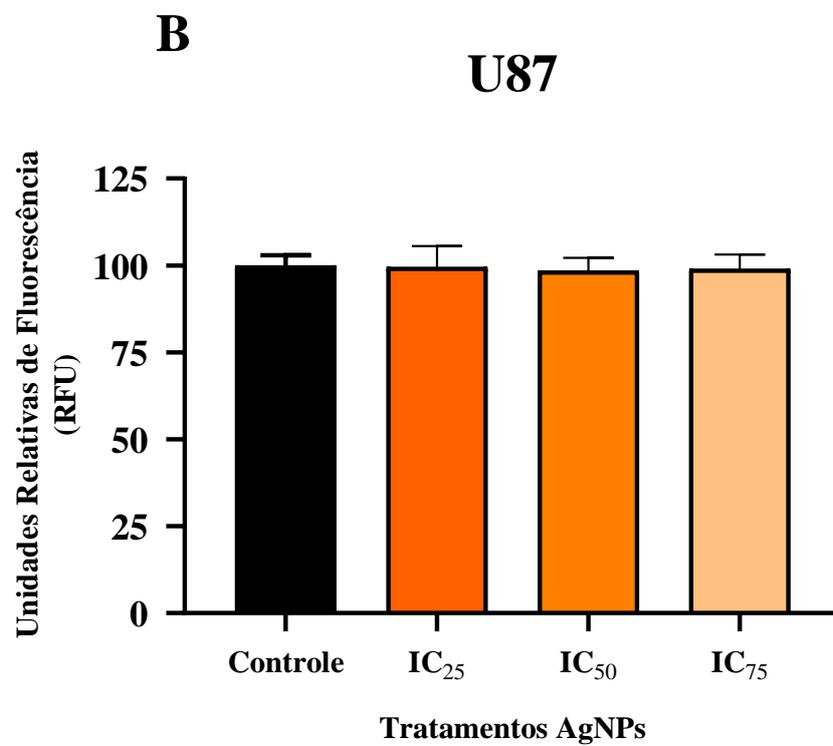
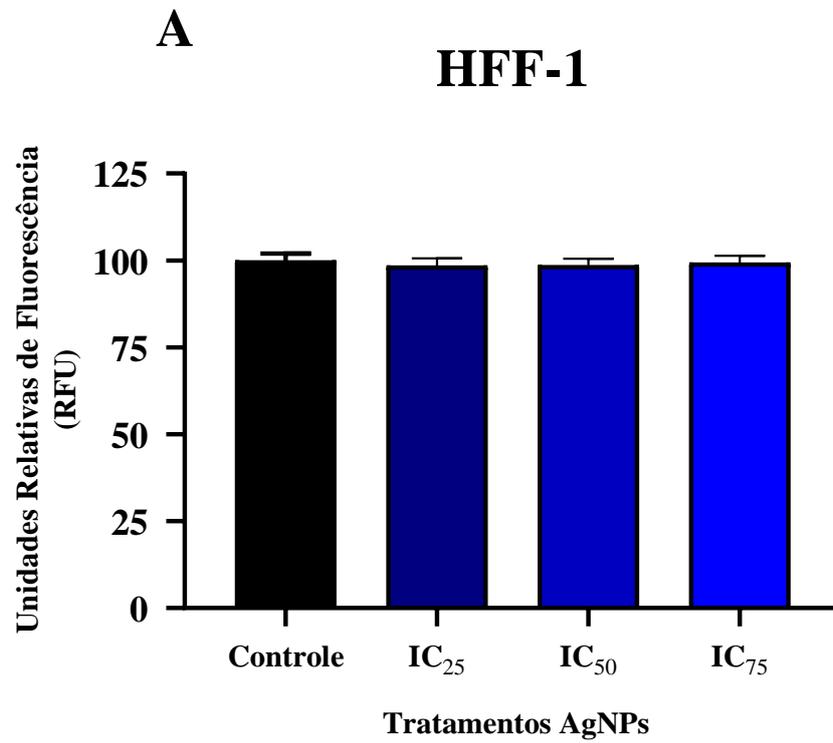


Figura 18: Análise da presença de ROS nas linhagens tumorais e não tumorais. As linhagens (A) HFF-1 e (B) U87 cultivadas por 48h com concentrações de IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ de AgNPs.

6. DISCUSSÃO

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que o número de pessoas diagnosticadas com câncer em 2020 foi de 19,3 milhões, com cerca de 10 milhões de óbitos. Estima-se que os casos de câncer no mundo aumentem em 60% até 2040, causando um número ainda maior de mortes (OMS, 2021). Esses dados são alarmantes, levando em consideração que agentes quimioterápicos convencionais diversos atualmente usados em diferentes tipos de câncer, apesar de eficazes, podem ter ação limitada devido à resistência aos medicamentos, toxicidade e efeitos colaterais graves (BERGAMINI *et al.*, 2019).

Além destes fatores, a alta possibilidade de desenvolvimento de metástases e o risco de contrair doenças infecciosas vêm a ser um motivo de preocupação, pois pacientes imunodeprimidos, geralmente contraem infecções durante os tratamentos quimioterápicos, provenientes de infecções derivadas de bactérias, o que geram muitas complicações podendo levar o paciente a morte (BERGAMINI *et al.*, 2019). Portanto, é indispensável a investigação e desenvolvimento de novas tecnologias que sejam capazes de prevenir infecções e tratar o câncer ao mesmo tempo, que ajam de forma mais eficiente para evitar efeitos colaterais sistêmicos, além de reduzir o tempo de tratamento (NASIR *et al.*, 2021).

Um grande número de agentes terapêuticos e de diagnóstico baseados em nanomateriais vêm sendo estudados e desenvolvidos, tanto para o tratamento do câncer, quanto para sua prevenção e diagnóstico. Tratamento direcionado, hipertermia, terapias fotodinâmicas e genéticas são alguns dos tratamentos de câncer que vem sendo desenvolvidos com base na nanotecnologia, e isso só está sendo possível devido a biocompatibilidade de muitos nanomateriais (WEI *et al.*, 2021). Dentre esses materiais, a maioria dos estudos na área de oncologia empregam as NPs como carreadores de fármacos ou se valem de suas propriedades térmicas para ensaios diagnósticos, no entanto pouco se discute sobre o papel das NPs não revestidas no tratamento oncológico.

Nanopartículas a base de ouro, platina e prata já são usadas em estudos relacionados à oncologia, porém a prata se destaca como promissora nas terapias antitumorais (POON *et al.*, 2020). As nanopartículas de prata são atualmente o nanomaterial mais utilizado na indústria e isto se deve principalmente à sua atividade antimicrobiana. AgNPs compartilham diversas características importantes como por exemplo, a capacidade de liberação de íons Ag⁺, característica que influencia diretamente no efeito citotóxico das nanopartículas contra microrganismos e células de organismos multicelulares (REIDY *et al.*, 2019). Além de sua

capacidade de transportar drogas, a toxicidade intrínseca das AgNPs, mediada pela indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outras ações, as tornam úteis como agentes de tratamento do câncer. Apesar disso, estas nanopartículas não tiveram suas aplicações biomédicas extensamente estudadas, de modo que são necessários estudos para avaliar seus efeitos em diversos tipos de organismos e células.

O presente trabalho avaliou o efeito do tratamento com AgNPs na proliferação e viabilidade de linhagens de células humanas, com o intuito de verificar se as células são afetadas pelas nanopartículas de prata. Para isto, foram utilizadas nanopartículas de prata previamente descrita pelo grupo: AgNPs de 15 nm sintetizadas quimicamente e caracterizadas por Espalhamento Dinâmico De Luz (DLS), que mostraram a maior parte das AgNPs apresentaram diâmetro médio de $14 \pm 3,97$ nm; Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), demonstrando que as nanopartículas possuem formato majoritariamente esférico; Energia Dispersiva de Raios X (EDS) forneceram um espectro que confirmando a presença de átomos de prata (prata metálica) e por Difração de Raios X (DRX) onde foram encontradas nanopartículas de natureza cúbica de face centrada, estrutura cristalina característica de AgNPs (ISMÉRIO, 2021).

Para a realização dos ensaios *in vitro* as curvas de crescimento foram feitas para determinar a melhor densidade celular para serem utilizadas nos ensaios. Pois é essencial familiarizar-se com o ciclo celular de crescimento de cada linhagem celular, uma vez que, diferentes tipos celulares e também células em diferentes fases se comportam de maneira distinta em relação a proliferação, atividade metabólica entre outros fatores. De acordo com o descrito por LEICA (2021), as culturas de células aderentes devem ser mantidas com confluência entre 70-80% (subconfluência), ou seja, em fase log para garantir o crescimento celular adequado e a saúde das células. Sendo assim, tendo em vista a duração dos ensaios de proliferação e viabilidade, 72h e 48h, respectivamente, além do tempo de incubação para adesão na placa de 96 poços, não é ideal que o poço esteja com alta ou baixa confluência de células a partir do primeiro dia o que poderia inibir a replicação ou até mesmo levar a morte das células. Com isso, após a realização dos ensaios de curva de crescimento, as concentrações determinadas para o plaqueamento de células para as análises foram 10^4 para a HFF-1 e 10^3 para U87 e DU-145.

Após a definição da densidade celular a ser utilizada, a proliferação celular, a viabilidade e a produção de espécies reativas de oxigênio, foram avaliadas através do método a análise de alto conteúdo (HCA). Técnica que vem sendo muito usada no campo da biologia

do câncer e sua principal aplicação tem sido a descoberta de drogas e nesse trabalho foi utilizada em substituição aos métodos tradicionais, com objetivo de aumentar a sensibilidade da análise de muitas amostras, reduzindo o tempo e minimizando avaliações tendenciosas do operador (GARVEY *et al.*, 2016; EUGENIO *et al.*, 2018).

A literatura mostra que células tumorais tratadas com nanopartículas de prata apresentam redução na taxa de crescimento, bem como na viabilidade celular. VELENZUELA *et al.*, (2019), por exemplo, mostraram 72% de inibição celular proliferação de melanoma. Outro estudo utilizou AgNPs formadas que exibiram atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama, células MCF-7 (JACOB *et al.*, 2017). Células de adenocarcinoma gástrico (AGS) tratadas com concentrações entre 5 e 20 µg/mL de nanopartículas de prata apresentaram redução dose-dependente na viabilidade celular e alterações na morfologia celular e nuclear, incluindo a fragmentação e condensação do DNA (PATIL *et al.*, 2017). GONZÁLEZ-BALLESTEROS *et al.*, (2019), mostram ainda que células de diferentes linhagens podem responder de forma diferente à tratamentos com nanopartículas. No presente trabalho também observamos efeitos diferentes dentre as linhagens avaliadas e os resultados obtidos revelaram que os tratamentos com nanopartículas de prata não induziram alterações significativas na proliferação celular da linhagem HFF-1, exceto quando exposta à concentração mais alta de AsNPs (100 µg/mL) por 24h, onde apresentou ligeira redução no crescimento (limitado a 16,50%). Oliveira *et al.*, (2018) mostra como as linhagens fibroblastos (HFF-1) são importantes modelos celulares para variadas aplicações biomédicas e laboratoriais da cultura de células: como células alimentadoras para o cultivo de células-tronco embrionárias humanas, em co-cultura com outros tipos celulares, para obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas, em cultura viral, em estudo da patogênese de outros microrganismos, em estudos variados de fisiologia celular e interações celulares e principalmente para testar a toxicidade e efeito de substâncias em células normais, especialmente a toxicidade de possíveis drogas antineoplásicas.

As linhagens tumorais apresentaram diminuição significativa na proliferação em ambas as células (U87 e DU-145), onde U87 chegou a uma inibição de 89,30%, apresentando $IC_{50} = 12,16 \mu\text{g/mL}$ e DU-145 diminuiu a proliferação em 76,74%, apresentando $IC_{50} = 26,19 \mu\text{g/mL}$ após 72h de tratamento. Os resultados mostraram um IC_{50} que se mantém até 48h e diminui em após 72h em DU-145 e na linhagem U87 o IC_{50} reduz com o aumento do tempo de tratamento, além de se apresentar muito menor nas células tumorais em relação as células HFF-1. Indicando que houve uma eficiência de tratamento em função do tempo e para as

células tumorais os tratamentos mais eficientes foram em 72h. Esses valores de redução da proliferação foram próximos ao que MAJID *et al.*, (2021) encontrou com AgNPs em células MCF-7 (câncer de mama) de quase 75% também após 72h com $IC_{50} = 18,05 \mu\text{g/mL}$ e quase 65% para células HeLa (câncer cervical) com $IC_{50} = 21,69 \mu\text{g/mL}$ pelo mesmo período de tratamento (72h). Porém, as mais baixas concentrações de AgNPs utilizadas (até $6,25 \mu\text{g/mL}$) pareceram induzir proliferação em também em ambas as células tumorais em 48h. Alguns estudos na literatura relatam que NPs podem causar a indução da proliferação em células humanas. Isso pode ocorrer tanto em células tumorais quanto não tumorais, após serem tratadas *in vitro* utilizando diferentes tipos de nanopartículas, incluindo nanopartículas metálicas, como as AgNPs. HU *et al.*, 2019 observou este efeito em células tronco mesenquimais (MSCs) quando foram tratadas com AgNPs a uma concentração de $4 \mu\text{g/mL}$, as células dobraram o nível de proliferação, quando comparado com o controle, após 48h de cultura. O mesmo foi visto por STHIJNS *et al.* (2017) em células de carcinoma pulmonar - A549 com doses de $2,5$ e $5 \mu\text{g/mL}$ de AgNPs. O estímulo de crescimento foi observado em todos os casos em que as células foram tratadas com baixas concentrações de nanopartículas. O estímulo do crescimento deve ser melhor estudado e pode ser perigoso na administração de NPs em pacientes durante tratamentos médicos, assim como o câncer, tendo em vista a possibilidade de ocorrer um efeito acidental indesejado, isto é, a indução da proliferação. Apesar desse leve aumento na proliferação, o TDDP, que é amplamente utilizado para quantificação de crescimento tumoral, foi mantido nas células HFF-1 e aumentou quase 2 vezes nas linhagens U87 e DU-145 após 72h de interação das células com as $100 \mu\text{g/mL}$ de AgNPs. Contudo, nas células tumorais os dados obtidos serviram para mostrar uma inibição da proliferação e um TDDP que aumentam em função do aumento da concentração de AgNPs e uma taxa de crescimento que diminui. Esse comportamento dose-dependente já foi descrito anteriormente por outros autores, BETHU *et al.*, (2019), por exemplo, mostraram inibição dose-dependente da proliferação de diferentes células cancerígenas, incluindo DU145 e PC-3 (linhas celulares de carcinoma de próstata humano), SKOV3 (carcinoma de ovário humano) e A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), ao serem tratadas com AgNPs esféricas, com os tamanhos variando entre 10-30 nm. Contudo, os resultados obtidos com o ensaio de proliferação indicam que a linhagem não tumoral HFF-1 apresenta menos sensibilidade ao tratamento com AgNPs, em relação as células tumorais U87 e DU-145, que apresentaram maior diminuição no número de células e interferiram de forma mais acentuada na taxa de

crescimento e no tempo de duplicação em concentrações iguais ou acima de 12,5 µg/mL de AgNPs utilizadas nesse estudo.

A degradação do DNA é outro fator evidenciado em células tratadas com AgNPs (ADEYEMI *et al.*, 2020), com isso, ensaios de fluorescência são utilizadas para saber se houve degradação do DNA (CARRIERE *et al.*, 2017; MAKI *et al.*, 2020; RAWLINSON *et al.*, 2010). ANGUISSOLA *et al.* (2014) testaram a potencial citotoxicidade induzida por nanopartículas poliestireno modificado com amina de 50 nm (PS-NH₂NPs) em linhagens de diferentes tipos de órgãos: astrocitoma humano (1321N1), neuroblastoma humano (SHSY5Y), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), rim embrionário humano (HEK293) e células de adenocarcinoma alveolar humano (A549), utilizando diversos parâmetros de HCA com o uso de corantes fluorescentes com espectros de excitação/emissão. Para avaliar diferentes parâmetros, entre eles, as mudanças na morfologia nuclear, onde após tais avaliações todas as linhagens celulares apresentaram diminuição da área nuclear, um indicativo de condensação nuclear. Segundo RAWLINSON *et al.* (2010), esse encolhimento celular e a condensação da cromatina são marcadores de apoptose. O aumento na área celular está associado ao inchaço nuclear como indicativo de necrose. Além disso, o aumento da intensidade nuclear indica um aumento na permeabilidade da membrana plasmática (PMP) permitindo que mais corantes entrem na célula. E a diminuição dessa fluorescência indica danos no DNA (degradação do DNA) (ANGUISSOLA *et al.*, 2014). No presente estudo, os resultados indicam que a linhagem HFF-1, não sofreu alterações significativas na área nuclear e pouca perda da intensidade fluorescência dos conteúdos de DNA, indicando que não houveram danos ao DNA dessas células. Em contrapartida, as linhagens U87 e DU-145 sofreram reduções na área do núcleo, bem como no conteúdo de DNA, indicando haver danos no DNA (fragmentação do DNA) e possível condensação nuclear, devido a morte por apoptose dessas células como efeito do tratamento com as AgNPs.

O ensaio de viabilidade celular é um dos primeiros passos para investigar a toxicidade de um material na área da saúde. São fundamentais para a observação da ação de diferentes nanomateriais, pois fornecem informações sobre a indução da citotoxicidade, em termos de mortalidade celular (FAYEZ; EL-MOTALEB & SELIM., 2020). HAQUE *et al.* (2021) conduziram um ensaio de viabilidade celular usando reagente MTT, para avaliar a biocompatibilidade de NPs de prata em linhagens celulares normais (CHO, HEK-293T, EA.hy926 e H9c2) e de câncer (U-87, PANC-1, MCF-7, HeLa e B16F10). Os tratamentos com as NPs não mostraram morte significativa de células normais nos tempos testados (24h e

48h), mesmo em concentrações mais altas, indicando a natureza biocompatível das nanopartículas. As NPs se mostraram altamente citotóxicas para as células cancerosas de maneira dose-dependente, as reduções percentuais para HeLa, MCF-7, PANC-1, U-87 e B16F10 após 48h de incubação foi de 60%, 50–80%, 50–70%, ~80% e 40– 50%, respectivamente. Os resultados mostraram citotoxicidade maior (cerca de 80%) nas células U87, pode ser devido à presença de uma capacidade de direcionamento cerebral. Esse efeito citotóxico ocorreu também contra as outras linhagens celulares de câncer SKOV3, DU145, PC-3 e A549 e baixa citotoxicidade contra a linhagem celular normal de mamífero CHO nos estudos de BETHU *et al.* (2019). Nesse estudo, avaliou-se a viabilidade das células por dois métodos colorimétricos com mecanismos celulares diferentes: O ensaio de MTT, ensaio colorimétrico para usado para avaliar a viabilidade das células por medição da atividade metabólica celular. Baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases encontradas em células metabolicamente ativas reduzir o corante tetrazólio MTT em formazan, que possui coloração roxa e a análise por HCA, usado para avaliar a viabilidade celular por quantificação de células mortas (HAQUE *et al.*, 2021). Onde utilizou-se o PI, um corante que se intercala com o DNA dos núcleos, emitindo luz fluorescente vermelha. Ele penetra livremente nas membranas celulares de células mortas, mas é excluído das células viáveis (ZHI *et al.*, 2020). Nos resultados obtidos também observamos efeitos diferentes em cada linhagem celular. As células HFF-1 apresentaram ligeira perda de viabilidade somente nos tratamentos com a concentração mais alta 100 µg/mL, em ambas as metodologias. Por outro lado, as linhagens U87 e DU-145 apresentaram reduções bastante significativas da viabilidade nos métodos avaliados. U87 apresentou perda de viabilidade celular em concentrações entre 3,125 e 100 µg/mL, quando testadas por MTT e entre 12,5 e 100 µg/mL, no teste por HCA. O tratamento de DU-145 mostrou uma redução na viabilidade a partir de 12,5 µg/mL de AgNPs, tanto nos testes de MTT quanto por HCA. Além disso, através do IC₅₀ calculado no ensaio de viabilidade por MTT, o tratamento com AgNPs se mostrou seletivo para as células tumorais U87 e DU-145 em relação as células não tumorais HFF-1.

A biocompatibilidade das células não tumorais pode ocorrer devido ao fato da menor captação celular de NPs em comparação com a células tumorais, que apresentam à maior taxa metabólica celular e superexpressão de receptores (HAQUE *et al.*, 2021). Os efeitos mais pronunciados observados em células tumorais tratadas com nanopartículas de prata também podem estar relacionados ao microambiente. MAC EWAN *et al.* (2010) relatou que as NPs poderiam responder ao baixo pH (mais ácido) extracelular do microambiente tumoral (KATO

et al., 2013), já que nanopartículas de prata podem liberar mais íons Ag^+ quando em ambiente ácido (PERETYAZHKO *et al.*, 2014). A partir desta descoberta, URBANSKA *et al.* (2015) criaram a hipótese que a liberação de íons de prata de AgNPs seria maior nas células tumorais em comparação com células normais, de modo que uma maior liberação de íons poderia levar a uma maior citotoxicidade. Isso explicaria o efeito antiproliferativo diferencial observado para células tumorais *versus* células saudáveis.

A geração de ROS é um dos mecanismos pelos quais as NPs exercem sua toxicidade. A produção celular de ROS pode ser induzida por tratamentos com AgNPs, como demonstrado por QUAN *et al.* (2021) em células de câncer colorretal (HCT116). As AgNPs induziram a produção de espécies reativas de oxigênio, que refletiram na disfunção mitocondrial e respostas ao estresse do retículo endoplasmático (RE) através do NOX4 e levaram à apoptose das células HCT116. O aumento no nível da geração de espécies reativas de oxigênio por ação da AgNPs também foi observado em diferentes linhagens celulares, por exemplo, em células câncer da tireoide (TPC1) (YANG *et al.*, 2020), carcinoma hepatocelular (HepG2) (RAJ *et al.*, 2020), câncer de mama (MCF-7) (KHADER *et al.*, 2020), câncer de ovário (SKOV3) (BETHU *et al.*, 2019) e câncer de próstata (DU145) (SINGH *et al.*, 2021). No presente trabalho, porém, ambas as linhagens (HFF-1 e U87) não apresentaram aumento geração de ROS após os tratamentos com as AgNPs. Isso porque, segundo os estudos de ZHANG *et al.* (2018), o aumento da produção de ROS é visualizada em maior proporção nas primeiras horas de interação das células com as AgNPs, mais precisamente após 4h de tratamento. A estabilização da geração de ROS foi provavelmente devido à geração de ROS inicial que desencadeou o sistema antioxidante nas células que diminuíram os níveis de ROS após as 48h de interação. Estes sistemas antioxidantes nas células, incluem principalmente enzimas antioxidantes e antioxidantes como SOD (superóxido dismutase) e GSH (glutathiona) (POON *et al.*, 2020). Estudos mostraram que a presença de ROS ativarão SOD ou GSH para manter um equilíbrio dinâmico entre os níveis de oxidação e antioxidantes. A peroxidação lipídica (LPO) desempenha um papel significativo no controle da divisão celular e é a manifestação do dano oxidativo causado pelas ROS. O GSH, é um importante sequestrador de radicais livres, desempenha um papel importante na manutenção do estado redox celular e protege as células dos danos oxidativos devido às ROS. O estresse oxidativo ocorre quando a geração de ROS excede a capacidade do mecanismo de defesa antioxidante. ROS e estresse oxidativo danificam a membrana celular, levando à peroxidação lipídica. Além disso, danos

no DNA, morte celular apoptótica, redução na geração de ATP também são induzidos por ROS, e eventualmente levam à morte celular (POON *et al.*, 2020; NAKVASINA *et al.*, 2021).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que as AgNPs são promissoras como agentes antitumorais, uma vez que afetam a proliferação e a viabilidade de células tumorais U87 e DU-145, com mínimos efeitos em células não tumorais HFF-1. É importante enfatizar que um maior espectro de tumores que podem ser sensíveis ao tratamento com estas AgNPs, portanto outros tipos celulares devem ser testados. Além disso, ensaios adicionais com as linhagens celulares são necessários para investigar melhor os efeitos na proliferação observados. Análises morfológicas ajudarão a compreender possíveis mudanças estruturais que levaram ao aumento da eficácia dos tratamentos e aos pequenos estímulos da proliferação em baixas concentrações nos ensaios com AgNPs observado nas linhagens celulares, assim como, verificar estruturas alvo das NPs dentro das células. Análises ultraestruturais também podem ajudar a entender os motivos pelos quais as AgNPs são mais efetivas em células tumorais do que em células saudáveis, bem como investigar quais estruturas são modificadas e qual a localização das AgNPs após o tratamento.

7. CONCLUSÃO

- O tratamento com AgNPs não interferiu na proliferação celular da linhagem HFF-1, enquanto nas células U87 e DU-145 causou a diminuição da proliferação, onde as concentrações mais altas foram capazes de diminuir de forma mais eficiente a proliferação das linhagens tumorais.
- As taxas de crescimento e o tempo de duplicação de HFF-1 não foram afetadas pelo tratamento. Enquanto, o perfil observado nas linhagens tumorais foi a diminuição das taxas de crescimento e o aumento do tempo de duplicação celular.
- O tratamento com AgNPs não causou diferença nas áreas dos núcleos de células HFF-1, no entanto causaram pouca diminuição da intensidade de fluorescência do núcleo. Já as células U87 e DU145 sofreram reduções na área bem como no conteúdo de DNA, indicando que haver danos no DNA.
- As células HFF-1 foram menos sensíveis ao tratamento em relação a viabilidade celular. Já nas células U87 e DU-145 a viabilidade foi reduzida de maneira efetiva. Demonstrando seletividade das AgNPs pelas células tumorais U87 e DU-145.

- As linhagens HFF-1 e U87 não apresentaram aumento da geração de ROS após 48h de interação com as AgNPs.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI, O. S., SHITTU, E. O., AKPOR, O. B., ROTIMI, D., & BATIHA, G. E. Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage. **EXCLI journal**, 19, 492–500 2020.

ADEWALE, O. B., DAVIDS, H., CAIRNCROSS, L., & ROUX, S. Toxicological Behavior of Gold Nanoparticles on Various Models: Influence of Physicochemical Properties and Other Factors. **International journal of toxicology**, 38(5), 357–384, 2019.

AHMAD F., ASHRAF N., ASHRAF T., ZHOU R., YIN D. Biological synthesis of metallic nanoparticles (MNPs) by plants and microbes: their cellular uptake, biocompatibility, and biomedical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p.2913-2935. 2019.

ALBERNAZ, V.L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do **Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília**, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia, 2014.

ALMALKI, M. A., & KHALIFA, A. Silver nanoparticles synthesis from *Bacillus* sp KFU36 and its anticancer effect in breast cancer MCF-7 cells via induction of apoptotic mechanism. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, 204, 111786, 2020.

ALY, F. M., OTHMAN, A., & HARIDY, M. Protective Effects of Fullerene C₆₀ Nanoparticles and Virgin Olive Oil against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 1261356, 2018.

AMARNATH PRAPHA KAR, R., JEYARAJ, M., AHMED, M., SURESH KUMAR, S., & RAJAN, M. Silver nanoparticle functionalized CS-g-(CA-MA-PZA) carrier for sustainable

anti-tuberculosis drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, 118(Pt B), 1627–1638, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Early history of cancer | American Cancer Society., p. <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes.html>, 2020.

AN, J., PENG, C., TANG, H., LIU, X., & PENG, F. New Advances in the Research of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. **International journal of molecular sciences**, 22(17), 9644, 2021.

ANGUISSOLA, S. et al. High Content Analysis Provides Mechanistic Insights on the Pathways of Toxicity Induced by Amine-Modified Polystyrene Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108025, 2014.

APOLINÁRIO, A. C., SALATA, G. C., BIANCO, A. F. R., FUKUMORI, C., & LOPES, L. B. Abrindo a Caixa de Pandora dos Nanomedicamentos: há realmente muito mais ‘espaço lá embaixo’. **Química Nova**, 43(2), 212-225, 2020.

BAI, X., WANG, Y., SONG, Z., FENG, Y., CHEN, Y., ZHANG, D., & FENG, L. As propriedades básicas das nanopartículas de ouro e suas aplicações no diagnóstico e tratamento de tumores. **Revista internacional de ciências moleculares**, 21 (7), 2480, 2020.

BARBALINARDO M., CAICCI F., CAVALLINI M., GENTILI D. Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. **Small**, v.14, p.1801219-1801219, 2018.

BARUA, S., BANERJEE, P.P., SADHU, A., SENGUPTA, A., CHATTERJEE, S., SARKAR, S., BARMAN, S., CHATTOPADHYAY, A., BHATTACHARYA, S., MONDAL, N.C., KARAK N. Silver nanoparticles as antibacterial and anticancer materials against human breast, cervical and oral cancer cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.16, p.1–9, 2016.

BELANOVA, A. A., GAVALAS, N., MAKARENKO Y., M., BELOUSOVA, M. M., SOLDATOV, A., V., ZOLOTUKHIN, P. V. Physicochemical Properties of Magnetic Nanoparticles: Implications for Biomedical Applications In Vitro and In Vivo. **Oncol Res Treat**, 41:139-143, 2018.

- BETHU, M. S., NETALA, V. R., DOMDI, L., TARTTE, V., & JANAPALA, V. R. Potential anticancer activity of biogenic silver nanoparticles using leaf extract of *Rhynchosia suaveolens*: an insight into the mechanism. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, 46(sup1), 104–114, 2019.
- BHUSHAN, B. Capítulo 1: Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education. Global Perspectives of Nanoscience and Engineering Education, Science Policy Reports. 1ª edição. **Springer International Publishing**, 2016.
- BOCATE, K. P., REIS, G. F., DE SOUZA, P. C., OLIVEIRA JUNIOR, A. G., DURÁN, N., NAKAZATO, G., FURLANETO, M. C., DE ALMEIDA, R. S., & PANAGIO, L. A. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International journal of food microbiology**, 291, 79–86, 2019.
- BRAYDEN, D.J., CRYAN, S.A., DAWSON, K.A., O'BRIEN, P.J. & SIMPSON, J.C., 2015. High-content analysis for drug delivery and nanoparticle applications. **Drug Discovery Today**, 20(8):942–957.
- BRZÓSKA, K., MĘCZYŃSKA-WIELGOSZ, S., STĘPKOWSKI, T. M., & KRUSZEWSKI, M. Adaptation of HepG2 cells to silver nanoparticles-induced stress is based on the proliferative and anti-apoptotic changes in gene expression. **Mutagenesis**, 30(3), 431–439, 2015.
- BUKOWSKI K, KCIUK M, KONTEK R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Int J Mol Sci.**,21(9):3233, 2020.
- BURDUȘEL, A. C., GHERASIM, O., GRUMEZESCU, A. M., MOGOANTĂ, L., FICAI, A., & ANDRONESCU, E. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. **Nanomaterials** (Basel, Switzerland), 8(9), 681, 2018.
- CARNOVALE, C, BRYANT, G, SHUKLA, R, BANSAL, V. Identifying trends in gold nanoparticle toxicity and uptake: size, shape, capping ligand, and biological corona. **ACS Omega**, 4(1):242–256, 2019.
- CARRIERE, M., SAUVAIGO, S., DOUKI, T., & RAVANAT, J. L. Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses. **Mutagenesis**, 32(1), 203–213, 2017.

- CHEON, J. Y., KIM, S. J., RHEE, Y. H., KWON, O. H., & PARK, W. H. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, *14*, 2773–2780, 2019.
- CHOI, J. H., MIN, W. K., GOPAL, J., LEE, Y. M., MUTHU, M., CHUN, S., & OH, J. W. Silver nanoparticle-induced hormesis of astrogloma cells: A Mu-2-related death-inducing protein-orchestrated modus operandi. **International journal of biological macromolecules**, *117*, 1147–1156, 2018.
- CREWE, A.V., WALL, J. & LANGMORE, J. Visibility of Single Atoms. **Science**, *12*:168(3937):1338-1340, 1970.
- CUI, C., YANG, J., LI, X., LIU, D., FU, L., & WANG, X. Functions and mechanisms of circular RNAs in cancer radiotherapy and chemotherapy resistance. **Molecular cancer**, *19*(1), 58, 2020.
- DONG, J., CARPINONE, P. L., PYRGIOTAKIS, G., DEMOKRITOU, P., & MOUDGIL, B. M. Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. **Kona: powder science and technology in Japan**, *37*, 224–232, 2020.
- ELSHATER, A. A., HARIDY, M., SALMAN, M., FAYYAD, A. S., & HAMMAD, S. Fullerene C₆₀ nanoparticles ameliorated cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity in rats. **Biomedicine & pharmacotherapy**, *97*, 53–59, 2018.
- EUGENIO M., MÜLLER N., FRASÉS S., ALMEIDA-PAES R., LIMA L.M.T.R., LEMGRUBER L., FARINA M., DE SOUZA W., SANT'ANNA C. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. **RSC Advances**, v.6, n.12, p. 9893-9904. 2016.
- EUROPEAN COMISSION. On the definition of a nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, v. 696, 2011.
- FEYNMAN, R. P.; **Eng. Sci.**, *23*, 22, 1960.
- FERREIRA, V.S., CONZ, M.E.F., LIMA, L.M.T.R., FRASÉS, S., DE SOUZA, W., SANT'ANNA C. Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v.97, p.114-121, 2017.

- GA'AL, H., FOUAD, H., MAO, G., TIAN, J., & JIANCHU, M. Larvicidal and pupicidal evaluation of silver nanoparticles synthesized using *Aquilaria sinensis* and *Pogostemon cablin* essential oils against dengue and zika viruses vector *Aedes albopictus* mosquito and its histopathological analysis. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, 46(6), 1171–1179, 2018.
- GARG, S., GARG, A. Encapsulation of Curcumin in Silver Nanoparticle for Enhancement of Anticancer Drug Delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 9(3), 2018.
- GARVEY, C. M. et al. A high-content image-based method for quantitatively studying context-dependent cell population dynamics. **Scientific reports**, v. 6, n. February, p. 29752, 2016.
- GUERRIERI, A. N., MONTESI, M., SPRIO, S., LARANGA, R., MERCATALI, L., TAMPIERI, A., LUCARELLI, E. Innovative Options for Bone Metastasis Treatment: An Extensive Analysis on Biomaterials-Based Strategies for Orthopedic Surgeons. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 8, 2020.
- HAQUE, S., NORBERT, C. C., ACHARYYA, R., MUKHERJEE, S., KATHIRVEL, M., & PATRA, C. R. Biosynthesized Silver Nanoparticles for Cancer Therapy and In Vivo Bioimaging. **Cancers**, 13(23), 6114, 2021.
- HAUSMAN, D. M. What Is Cancer? **Perspectives in biology and medicine**, 62(4), 778–784, 2019.
- HE, Y., TIAN, F., ZHOU, J., ZHAO, Q., FU, R., & JIAO, B. Colorimetric aptasensor for ochratoxin A detection based on enzyme-induced gold nanoparticle aggregation. **Journal of Hazardous Materials**, 121758, 2019.
- HERNANDEZ-RUEDA, J., BEURS, A., & OOSTEN, D. V. Ultrafast laser ablation of trapped gold nanoparticles. **Optics letters**, 44(13), 3294–3297, 2019.
- HOLMES, A.M., LIM, J., STUDIER, H., ROBERTS, M.S., 2016. Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against micro-organisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. **Nanotoxicology**, 10(10):1503-1514.

HU, D., GU, X., SI, W., QIN, W., JIAO, J., & HAO, Y. Biosynthesis of Silver nanoparticles using Bauhinia acuminata flower extract and their effect to promote osteogenesis of MSCs and improve meniscus injury healing. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, 197, 111536, 2019.

HUSSIEN, R., RIHN, B. H., EIDI, H., RONZANI, C., JOUBERT, O., FERRARI, L. & BROOKS, G. A. Unique growth pattern of human mammary epithelial cells induced by polymeric nanoparticles. **Physiological reports**, 1(4), 2013.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tratamento do câncer. **Ministério da Saúde**, 2020. Disponível em: www.inca.gov.br.

JAIN, K. K. Role of Nanobiotechnology in Drug Delivery. **Methods in molecular biology**, 55-73, 2020.

JALAL, M., ANSARI, M. A., ALZOHAIRY, M. A., ALI, S. G., KHAN, H. M., ALMATROUDI, A., & Siddiqui, M. I. Anticandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. **International journal of nanomedicine**, 14, 4667–4679, 2019.

JEEVANANDAM, J., BARHOUM, A., CHAN, Y. S., DUFRESNE, A., DANQUAH, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein J. Nanotechnol**, p. 1050–1074, 2018.

JENTSCH, T. J. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 17: 293, 2016.

JIAO, Z. H., LI, M., FENG, Y. X., SHI, J. C., ZHANG, J., & SHAO, B. Hormesis effects of silver nanoparticles at non-cytotoxic doses to human hepatoma cells. **PloS one**, 9(7), e102564, 2014.

JOKSIĆ, G., STAŠIĆ, J., FILIPOVIĆ, J., ŠOBOT, A. V., & TRTICA, M. Size of silver nanoparticles determines proliferation ability of human circulating lymphocytes in vitro. **Toxicology Letters**, 247, 29–34, 2016.

KANIPANDIAN, N., LI, D., & KANNAN, S. Induction of intrinsic apoptotic signaling pathway in A549 lung cancer cells using silver nanoparticles from *Gossypium hirsutum* and

evaluation of *in vivo* toxicity. **Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)**, *23*, e00339, 2019.

KHADER, S., SYED ZAMEER AHMED, S., GANESAN, G. M., MAHBOOB, M. R., VETRIVEL, M., SANKARAPPAN, M., & MANICKAM, P. Rhynchosia rufescens AgNPs enhance cytotoxicity by ROS-mediated apoptosis in MCF-7 cell lines. **Environmental science and pollution research international**, *27*(2), 2155–2164, 2020.

KHALID, M., KHALID, N., AHMED, I., HANIF, R., ISMAIL, M., JANJUA, H.A. Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities. **J Appl Phycol**, v.29, p.1851–1863, 2017.

KHAN, O., & CHAUDARY, N. The Use of Amikacin Liposome Inhalation Suspension (Arikayce) in the Treatment of Refractory Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in Adults. **Drug design, development and therapy**, *14*, 2287–2294, 2020.

KLEBOWSKI, B., DEPCIUCH, J., PARLIŃSKA-WOJTAN, M., & BARAN, J. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. **International journal of molecular sciences**, *19*(12), 4031, 2019.

KOOL, L., DEKKER, F., BUNSCHOTEN, A., SMALES, G. J., PAUW, B. R., VELDEERS, A. H., & SAGGIOMO, V. Gold and silver dichroic nanocomposite in the quest for 3D printing the Lycurgus cup. **Beilstein journal of nanotechnology**, *11*, 16–23, 2020.

KUMARI, M., PANDEY, S., GIRI, V. P., BHATTACHARYA, A., SHUKLA, R., MISHRA, A., & NAUTIYAL, C. S. Tailoring shape and size of biogenic silver nanoparticles to enhance antimicrobial efficacy against MDR bacteria. **Microbial pathogenesis**, *105*, 346–355, 2017.

LEE, S. H., & JUN, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International journal of molecular sciences**, *20*(4), 865, 2019.

LI, C., LI, Z., WANG, Y., & LIU, H., 2016. Gold Nanoparticles Promote Proliferation of Human Periodontal Ligament Stem Cells and Have Limited Effects on Cells Differentiation. **Journal of Nanomaterials**, 2016, 1–10.

LIAO, C., LI, Y., TJONG, S. C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **Jornal internacional de ciências moleculares**, *20* (2), 449, 2019.

LIU, Z., TAN H., ZHANG, X., CHEN, F., ZHOU, Z., HU, X., CHANG, S., LIU, P., ZHANG, H. Enhancement of radiotherapy efficacy by silver nanoparticles in hypoxic glioma cells. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 46. 1-9, 2018.

LOOS, M. Nanoscience and Nanotechnology: Carbon Nanotube Reinforced Composites. **CNR Polymer Science and Technology**, 1-36, 2017.

MAJID S. JABIR, AYA A. HUSSIEN, GHASSAN M. SULAIMAN, NAHI Y. YASEEN, YASER H. DEWIR, MONA S. ALWAHIBI, DINA A. SOLIMAN & HUMAIRA RIZWANA. Green synthesis of silver nanoparticles from *Eriobotrya japonica* extract: a promising approach against cancer cells proliferation, inflammation, allergic disorders and phagocytosis induction, **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 49:1, 48-60, 2021.

MAKI, A., LIN, Y., AOYAMA, M., SATO, K., GAO, J. Q., TSUJINO, H., NAGANO, K., HIGASHISAKA, K., & TSUTSUMI, Y. Silver Nanoparticles Induce DNA Hypomethylation through Proteasome-Mediated Degradation of DNA Methyltransferase 1. **Biological & pharmaceutical bulletin**, 43(12), 1924–1930, 2020.

MARCANO, O. A. Photothermal Determination of Absorption and Scattering Spectra of Silver Nanoparticles. **Applied spectroscopy**, 72(2), 234–240, 2018.

MATA, R., NAKKALA, J. R., CHANDRA, V. K., RAJA, K., & SADRAS, S. R. In vivo bio-distribution, clearance and toxicity assessment of biogenic silver and gold nanoparticles synthesized from *Abutilon indicum* in Wistar rats. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, 48, 157–165, 2018.

MESQUITA, G. Nanotecnologia: a ciência do invisível em ação. **CintilNet Notícias**, 2014.

MORAIS, M. G. DE, MARTINS, V. G., STEFFENS, D., PRANKE, P., & DA COSTA, J. A. V. Biological Applications of Nanobiotechnology. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 14(1), 1007–1017, 2014.

MORFOLO, M. J., KADHILA, P., CHINSEMBU, K. C., MASHELE, S. & MAMELLO, S. Green synthesis of silver nanoparticles from extracts of *Pechuel-loeschea leubnitziae*: their anti-proliferative activity against the U87 cell line. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, 1-7, 2020.

MURUGESAN, K., KOROTH, J., SRINIVASAN, P. P., SINGH, A., MUKUNDAN, S., KARKI, S. S., CHOUDHARY, B., & GUPTA, C. M. Effects of green synthesised silver nanoparticles (ST06-AgNPs) using curcumin derivative (ST06) on human cervical cancer cells (HeLa) in vitro and EAC tumor bearing mice models. **International journal of nanomedicine**, 14, 5257–5270, 2019.

NAKVASINA, M. A., KOLTAKOV, I. A., & ARTYUKHOV, V. G. Silver Nanoparticles Induce Changes in the Structural and Functional Properties of Human Lymphocytes. **Bulletin of experimental biology and medicine**, 170(4), 499–504, 2021.

NASIR, A., KHAN, A., LI, J., NAEEM, M., KHALIL, A., KHAN, K., & QASIM, M. (2021). Nanotechnology, A Tool for Diagnostics and Treatment of Cancer. **Current topics in medicinal chemistry**, 21(15), 1360–1376.

OSTASZEWSKA, T., ŚLIWIŃSKI, J., KAMASZEWSKI, M., SYSA, P., & CHOJNACKI, M. Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Environmental science and pollution research international**, 25(1), 908–915, 2018.

PANÁČEK, A., KVÍTEK, L., PRUCEK, R., KOLÁR, M., VECEROVÁ, R., PIZÚROVÁ, N., SHARMA, V.K., NEVECŇÁ, T., ZBORIL, R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **J. Phys. Chem**, B110: 16248-16253, 2014.

PANZARINI, E., MARIANO, S., CARATA, E., MURA, F., ROSSI, M., & DINI, L. Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses: An Update. **International journal of molecular sciences**, 19(5), 1305, 2019.

PATIL M.P., PALMA J., SIMEON N.C., JIN X., LIU X., NGABIRE D., KIM N., TARTE N.H., KIM G. *Sasa borealis* leaf extract-mediated green synthesis of silver–silver chloride

nanoparticles and their antibacterial and anticancer activities. **New J. Chem.**, v. 41, p. 1363-1371. 2017.

PAULL, R.; WOLFE, J.; HÉBERT, P. & SINKULA, M. Investing in nanotechnology. **Nature Biotechnology**, 21:1144-1147, 2003.

PONGRAC I.M., AHMED L.B., MLINARIĆ H., JURAŠIN D.D., PAVIČIĆ I., ČERMAK A.M., MILIĆ M., GAJOVIĆ S., VRČEK I.V. Surface coating affects uptake of silver nanoparticles in neural stem cells. **J Trace Elem Med Biol**, v.50, p. 684-692, 2018.

POON, W. L., LEE, J. C., LEUNG, K. S., ALENIUS, H., EL-NEZAMI, H., & KARISOLA, P. Nanosized silver, but not titanium dioxide or zinc oxide, enhances oxidative stress and inflammatory response by inducing 5-HETE activation in THP-1 cells. **Nanotoxicology**, 14(4), 453–467, 2020.

QUAN, J. H., GAO, F. F., CHU, J. Q., CHA, G. H., YUK, J. M., WU, W., & LEE, Y. H. Silver nanoparticles induce apoptosis via *NOX4*-derived mitochondrial reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress in colorectal cancer cells. **Nanomedicine** (London, England), 16(16), 1357–1375, 2021.

RAJ R, K., D, E., & S, R. β -Sitosterol-assisted silver nanoparticles activates Nrf2 and triggers mitochondrial apoptosis via oxidative stress in human hepatocellular cancer cell line. **Journal of biomedical materials research. Part A**, 108(9), 1899–1908, 2020.

RAWAT, R.S. Dense Plasma Focus - From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology. **Journal of Physics: Conference Series**. 591. 012021, 2015.

REZVANI, E., RAFFERTY, A., MCGUINNESS, C., & KENNEDY, J. Adverse effects of nanosilver on human health and the environment. **Acta biomaterialia**, 94, 145–159, 2019.

RIBEIRO, M. S., DE MELO, L., FAROOQ, S., BAPTISTA, A., KATO, I. T., NÚÑEZ, S. C., & DE ARAUJO, R. E. Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: In vitro evaluation on *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, 22, 191–196, 2018.

ROSÁRIO, F., HOET, P., NOGUEIRA, A., SANTOS, C., & OLIVEIRA, H. Differential pulmonary in vitro toxicity of two small-sized polyvinylpyrrolidone-coated silver

nanoparticles. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, 81(15), 675–690, 2018.

SAKONO, N., OMORI, K., YAMAMOTO, K., ISHIKURO, N., & SAKONO, M. Vapor-phase Synthesis of Bimetallic Plasmonic Nanoparticles. **Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, 36(1), 61–65, 2020.

SAKURADA T. Analysis of Risk Factors for Side Effects and the Establishment of Supportive Therapy during Cancer Chemotherapy. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, 138(11), 1363–1370, 2018.

SHANMUGANATHAN, R., KARUPPUSAMY, I., SARAVANAN, M., MUTHUKUMAR, H., PONNUCHAMY, K., RAMKUMAR, V. S., & PUGAZHENDHI, A. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications - A Comprehensive Review. **Current pharmaceutical design**, 25(24), 2650–2660, 2019.

SHERLEY, J.L., STADLER, P.B., STADLER, J.S. A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. **Cell Proliferation**, 28(3):137-44, 1995.

SILVA, L.P, BONATTO, C.C., PEREIRA, F.D.E.S., SILVA, L.D., ALBERNAZ, V.L., POLEZ V.L.P., Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas, **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, V. 4, p. 967 -1012, 2017.

SILVA, M., NOGUEIRA, D. J., VICENTINI, D. S., PUERARI, R. C., ALVES, P., FUZINATTO, C. F., & MATIAS, W. G. Rapid Communication: oxidative stress induced by mixed exposure to glyphosate and silver nanoparticles. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, 1–5. Advance online publication, 2022.

SINGH, P., PANDIT, S., MOKKAPATI, V., GARG, A., RAVIKUMAR, V., & MIJAKOVIC, I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. **International journal of molecular sciences**, 19(7), 1979, 2018.

SINGH, S.P., MISHRA, A., SHYANTI, R.K. *et al.* Silver Nanoparticles Synthesized Using *Carica papaya* Leaf Extract (AgNPs-PLE) Causes Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Prostate (DU145) **Cancer Cells. Biol Trace Elem Res** **199**, 1316–1331, 2021.

SLEPIČKA, P., SLEPIČKOVÁ KASÁLKOVÁ, N., SIEGEL, J., KOLSKÁ, Z., & ŠVORČÍK, V. Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. **Materials (Basel, Switzerland)**, 13(1), 1, 2019.

SMEKALOVA, M., ARAGON, V., PANACEK A., PRUCEK R., ZBORIL R., KVITEK L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. **The Veterinary Journal**, v.209, p.174–179, 2016.

SÖDERSTJERNA, E., JOHANSSON, F., KLEFBOHM, B., & ENGLUND JOHANSSON, U. Gold- and silver nanoparticles affect the growth characteristics of human embryonic neural precursor cells. **PloS one**, 8(3), e58211, 2013.

SRIRAM, M.I., KANTH, S.B., KALISHWARALAL, K., GURUNATHAN, S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. **International Journal of Nanomedicine**, 753, 2017.

STHIJNS, M. M., THONGKAM, W., ALBRECHT, C., HELLACK, B., BAST, A., HAENEN, G. R., & SCHINS, R. P. Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, 40, 223–233, 2017.

SUN, T., ZHANG, Y. S., PANG, B., XIA, Y. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, 46 (5), 2014.

TANIGUCHI, N., “On the basic concept of Nano-technology”, **International Conference on Production Engineering**, Tokyo, Part II, Vol. 2, pp. 18-23, 1974.

TRAPANI, J. A., & DARCY, P. K. Immunotherapy of cancer. **Australian family physician**, 46(4), 194–199, 2017.

VALENZUELA-SALAS, L. M., GIRÓN-VÁZQUEZ, N. G., GARCÍA-RAMOS, J. C., TORRES-BUGARÍN, O., GÓMEZ, C., PESTRYAKOV, A., VILLARREAL-GÓMEZ, L. J., TOLEDANO-MAGAÑA, Y., & BOGDANCHIKOVA, N. Antiproliferative and Antitumour Effect of Nongenotoxic Silver Nanoparticles on Melanoma Models. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 4528241, 2019.

VAN HAUTE, D., LIU, A. T., BERLIN, J. M. Coating metal nanoparticle surfaces with small organic molecules can reduce nonspecific cell uptake. **ACS Nano**, 12(1):117–127, 2018.

VERMA, A.S., AGRAHARI, S., RASTOGI, S., & SINGH, A. Biotechnology in the realm of history. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, 3 (3), 321-323, 2011.

VIJAYAKUMAR, S., MALAIKOZHUNDAN, B., SARAVANAKUMAR, K., DURÁN-LARA, E. F., WANG, M. H., & VASEEHARAN, B. Garlic clove extract assisted silver nanoparticle - Antibacterial, antibiofilm, antihelminthic, anti-inflammatory, anticancer and ecotoxicity assessment. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, 198, 111558, 2019.

WANG, D., ZHENG, X., FU, B., NIAN, Z., QIAN, Y., SUN, R., TIAN, Z., & WEI, H. Hepatectomy promotes recurrence of liver cancer by enhancing IL-11-STAT3 signaling. **EBioMedicine**, 46, 119–132, 2019.

WANG, D., ZHENG, X., FU, B., NIAN, Z., QIAN, Y., SUN, R., TIAN, Z., & WEI, H. Hepatectomy promotes recurrence of liver cancer by enhancing IL-11-STAT3 signaling. **EBioMedicine**, 46, 119–132, 2019.

WEI, G., WANG, Y., YANG, G., WANG, Y., & JU, R. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. **Theranostics**, 11(13), 6370–6392, 2021.

WHO - World Health Organization. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, 2018. Disponível em: www.who.int.

WU, M., GUO, H., LIU, L., LIU, Y., & XIE, L. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, 14, 4247–4259, 2019.

WUSIMAN, A., GU, P., LIU, Z., XU, S., ZHANG, Y., HU, Y., LIU, J., WANG, D., E HUANG, X. (2019). Nanopartículas de PLGA modificadas por polímeros catiônicos que encapsulam os polissacarídeos de mel Alhagi como um sistema de entrega de vacina para a ovalbumina para melhorar as respostas imunes. **Revista internacional de nanomedicina**, 14, 3221–3234, 2019.

XIA, Y., XU, C., ZHANG, X., NING, P., WANG, Z., TIAN, J., & CHEN, X. Liposome-based probes for molecular imaging: from basic research to the bedside. **Nanoscale**, 11(13), 5822–5838, 2019.

- YANG, G., PHUA, S. Z. F., BINDRA, A. K. & ZHAO, Y. Degradability and Clearance of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications. **Advanced Materials**, 1805730, 2019.
- YANG, J., WANG, Q., WANG, C., YANG, R., AHMED, M., KUMARAN, S., VELU, P., & LI, B. *Pseudomonas aeruginosa* synthesized silver nanoparticles inhibit cell proliferation and induce ROS mediated apoptosis in thyroid cancer cell line (TPC1). **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, 48(1), 800–809, 2020.
- YOUNG, D.W., BENDER, A., HOYT, J., McWHINNIE, E., CHIRN, G.W., et al. Integrating high-content screening and ligand-target prediction to identify mechanism of action. **Nature Chemical Biology**, 4:59–68, 2018.
- ZHANG, L., WU, L., SI, Y., & SHU, K. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. **PloS one**, 13(12), e0209020, 2018.
- ZHANG, W., SCHWAB, A. P., WHITE, J. C., & MA, X. Impact of Nanoparticle Surface Properties on the Attachment of Cerium Oxide Nanoparticles to Sand and Kaolin. **Journal of Environment Quality**, 47(1), 129, 2018.
- ZHOU, B., HAO, Y., CHEN, S., & YANG, P. A quartz crystal microbalance modified with antibody-coated silver nanoparticles acting as mass signal amplifiers for real-time monitoring of three latent tuberculosis infection biomarkers. **Mikrochimica acta**, 186(4), 212, 2019.
- ZHI, S. M., FANG, G. X., XIE, X. M., LIU, L. H., YAN, J., LIU, D. B., & YU, H. Y. Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling. **European review for medical and pharmacological sciences**, 24(3), 1524–1536, 2020.
- ZOU, J., ZHU, B., & LI, Y. Functionalization of Silver Nanoparticles Loaded with Paclitaxel-induced A549 Cells Apoptosis Through ROS-Mediated Signaling Pathways. **Current topics in medicinal chemistry**, 20(2), 89–98, 2020.