

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO/AFYA  
INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – CAMPUS ZONA OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL

BÁRBARA GOMES DE CARVALHO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL  
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM LINHAGEM CELULAR DE PULMÃO**

**Orientadores:** Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira  
Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho

Duque de Caxias  
2024

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>18</b> |
| 1.1 Desenvolvimento da nanotecnologia e nanociência .....   | 18        |
| 1.2 Nanopartículas e a Nanotecnologia .....   | 21        |
| 1.2.1 Definições, peculiaridades e aplicabilidades .....  | 21        |
| 1.3 Câncer .....  | <b>23</b> |
| 1.3.1 Epidemiologia Global e nacional .....   | 24        |
| 1.3.2 Câncer de pulmão.....   | 25        |
| 1.4 Aplicação de nanopartículas de prata no tratamento de câncer.....   | 31        |
| 1.4.1 Síntese.....  | 33        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>  | <b>37</b> |
| 3.1 Objetivo Geral .....  | 37        |
| 3.2 Objetivos Específicos.....  | 37        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1 Reagentes.....  | 38        |
| 4.2 Síntese química por redução de nanopartículas de prata .....  | 38        |
| 4.3 Caracterização das nanopartículas de prata .....  | 41        |
| 4.3.1 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível (UV-Visível) .....  | 41        |
| 4.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....  | 41        |
| 4.3.3 Rastreamento de nanopartículas (NTA) .....  | 42        |
| 4.3.4 Difração de Raios X (DRX) .....   | 42        |
| 4.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....   | 42        |
| 4.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios X (EDS) .....                       | 42        |
| 4.4 Cultivo Celular .....   | 43        |
| 4.4.1 Meio de cultivo.....  | 43        |
| 4.4.2 Determinação das curvas de crescimento pelo ensaio colorimétrico MTT.....                                   | 43        |
| 4.5 Potencial antitumoral.....  | 44        |
| 4.5.1 Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT e determinação da concentração inibitória média IC-50..... | 44        |
| 4.5.2 Ensaio de viabilidade celular por atividade de Lactato Desidrogenase (LDH).....                             | 45        |
| 4.5.3 Monitoramento da Proliferação Celular em Tempo Real por Impedância Elétrica .....                           | 45        |
| 4.5.4 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo .....   | 46        |
| 4.5.5 Ensaio de migração celular.....   | 47        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.6 Análise estatística</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>48</b> |
| <b>5.1 Síntese química de AgNPs</b> .....  | <b>48</b> |
| <b>5.2 Caracterização das AgNPs</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>5.2.1 Espalhamento dinâmico da luz (DLS)</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>5.2.2 Rastreamento de Nanopartículas (NTA)</b> .....  | <b>58</b> |
| <b>5.2.3 Difração de Raios X (DRX)</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>5.2.5 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) com Energia Dispersiva de Raios X (EDS)</b> .....                     | <b>64</b> |
| <b>5.2.6 Preenchimento dos critérios de caracterização e análise dos melhores parâmetros para síntese de AgNPs</b> ..... | <b>66</b> |
| <b>5.3 ENSAIOS IN VITRO</b> .....  | <b>66</b> |
| <b>5.3.1 Curvas de Crescimento</b> .....   | <b>66</b> |
| <b>5.3.2 Efeitos das AgNPs na viabilidade das linhagens celulares A549 e BEAS-2B por MTT e LDH</b> .....                 | <b>68</b> |
| <b>5.3.3 Monitoramento celular em tempo real por impedância elétrica</b> .....   | <b>76</b> |
| <b>5.3.4 Avaliação da morte celular</b> .....  | <b>77</b> |
| <b>5.3.5 Efeito na migração celular</b> .....  | <b>80</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | <b>82</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>83</b> |

**Bárbara Gomes de Carvalho**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL  
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM LINHAGEM CELULAR DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Biomedicina Translacional, da Universidade do Grande Rio/AFYA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientadores:**

Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira

Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho

Duque de Caxias  
2024

**CATALOGAÇÃO NA FONTE UNIGRANRIO - NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE  
BIBLIOTECAS**

C331s Carvalho, Bárbara Gomes de.

Síntese, caracterização e avaliação do potencial antitumoral de nanopartículas de prata em linhagem celular de pulmão / Bárbara Gomes de Carvalho. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2024.

91 f. il.

Orientador: Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira.

Orientador: Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho.

Dissertação (mestrado) – UNIGRANRIO, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Rio de Janeiro, 2024.

1. Atividade antitumoral. 2. Câncer de pulmão. 3. Nanopartículas de prata. I. Pereira, Leonardo da Cunha Boldrini. II. Sant'Anna Filho, Celso Barbosa de. III. Título. IV. UNIGRANRIO.

CDD: 610

**Bárbara Gomes de Carvalho**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL  
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM LINHAGEM CELULAR DE PULMÃO**

A presente Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio/AYFA como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, foi aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Banca Examinadora**

Documento assinado digitalmente  
 **EMILE SANTOS BARRIAS**  
Data: 02/03/2024 13:25:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Emile Santos Barrias – Inmetro - Biotrans

Documento assinado digitalmente  
 **PRISCILLA VANESSA FINOTELLI**  
Data: 04/03/2024 14:30:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Priscilla Vanessa Finotelli - UFRJ

Documento assinado digitalmente  
 **ANTONIO PALUMBO JUNIOR**  
Data: 04/03/2024 12:47:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Antônio Palumbo Jr - UFRJ

# BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às 09 horas, do dia 01 de março de 2024, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Dissertação versando sobre o projeto intitulado "Síntese, caracterização e avaliação do potencial antitumoral de nanopartículas de prata em linhagem celular de pulmão", de autoria de Bárbara Gomes de Carvalho, aluna do Mestrado Acadêmico, sob orientação do Professor Leonardo da Cunha Boldrini Pereira e do Professor Celso Barbosa de Sant'anna Filho. A sessão foi aberta pela Profa. Emile Santos Barrias, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Antônio Palumbo Jr e Profa. Priscilla Vanessa Finotelli. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

A presidente declarou a mestranda Barbara Gomes de Carvalho **APROVADA**, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, as 12 h, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 01 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente



EMILE SANTOS BARRIAS  
Data: 02/03/2024 13:25:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Emile Santos Barrias  
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO  
Presidente da banca

Documento assinado digitalmente



ANTONIO PALUMBO JUNIOR  
Data: 04/03/2024 12:47:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Antônio Palumbo Jr  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Documento assinado digitalmente



PRISCILLA VANESSA FINOTELLI  
Data: 04/03/2024 14:30:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Priscilla Vanessa Finotelli  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Sergian Vianna Cardozo  
Coordenador Geral

Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS



# BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Afya



**(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações**

Comentários:

Não se aplica.

Presidente:



Documento assinado digitalmente

EMILE SANTOS BARRIAS

Data: 02/03/2024 13:25:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais, sem eles não chegaria até aqui. Sempre serão meu estímulo e referência para seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me conceder a capacidade de aprender e por me dar forças para continuar. Aos meus pais por todo auxílio, carinho, apoio e estímulo em toda a trajetória. Se cheguei até aqui, foi por eles e por conta deles. Sou muita grata e sempre serei.

Aos meus colegas do laboratório pelo incentivo em momentos difíceis, pela ajuda e auxílio em experimentos e, principalmente pela parceria do dia a dia. Agraço a Beatriz Kopke, Lorena Maduro, Beatriz Lima, Rebeca Andrade, Wanderson de Souza, Bárbara Furtado, Marjorie Dardis, Ekeveliny Amabile, Nathalia Yoshihara, Diego Wiechers e Michele Lopes.

Preciso fazer um agradecimento especial a minha dupla Marjorie Dardis que foi um anjo para mim, cheia de luz e com um coração enorme, deixando meus dias mais leves e com muita fé. A Beatriz Kopke por me auxiliar nos ensaios celulares e ter a paciência e dedicação para me passar seu conhecimento. Ao Wanderson de Souza por sempre se mostrar disposto desde a minha iniciação científica, me auxiliando em experimentos e, principalmente, me fazendo ser crítica e analítica. Agradeço também, por todos os elogios “disfarçados” e incentivo para continuar. Por último, a Lorena Maduro e Bárbara Furtado por me auxiliarem em experimentos celulares e por sempre estarem presentes para ouvir e ajudar.

Não poderia deixar de agradecer ao meu namorado, meu confidente e meu melhor amigo por todo carinho, parceria e dedicação. Foram horas me aguardando ou me acompanhando em um final de semana de experimentos no laboratório, sempre com muita paciência e amor.

Agradeço aos meus orientadores, Leonardo Boldrini e Celso Sant’Anna por toda paciência e auxílio durante essa trajetória e, principalmente, por terem me dado a oportunidade de realizar o mestrado. Queria agradecer em especial ao Leonardo Boldrini que me acompanha desde a minha iniciação científica, sendo sempre muito empático, respeitoso e solícito. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua equipe.

Finalmente, agradeço ao INMETRO pelo espaço para a realização da pesquisa, a bolsa concedida pela CAPES e ao Programa BIOTRANS da UNIGRANRIO/INMETRO/UERJ por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado.

Meu muito obrigada a todos vocês!

## EPÍGRAFE

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito”*

(Martin Luther King)

## RESUMO

O câncer de pulmão é um problema global de saúde pública devido à sua alta incidência, prevalência e mortalidade. As nanopartículas de prata (AgNPs) mostram atividade antitumoral e são promissoras para mitigar efeitos adversos e resistência medicamentosa que ocorrem em tratamentos convencionais. No entanto, há lacunas a serem esclarecidas, como os mecanismos de ação antitumoral, estabilidade em meios biológicos e potencial citotóxico para tecidos saudáveis. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi de sintetizar e caracterizar AgNPs, utilizando diferentes protocolos por síntese química, visando posterior avaliação do potencial antitumoral em linhagem celular de câncer de pulmão (A549) e o efeito citotóxico em linhagem não tumoral de pulmão (BEAS-2B). Foram sintetizados oito lotes de AgNPs, sendo selecionados dois (lotes 02 e 05) com base em critérios de exclusão (coloração, turbidez e UV-visível) e caracterização (MET, DRX, PZ, EDS acoplado ao MEV e NTA). Ao final, dois lotes de AgNPs (02 e 05) foram selecionados, visto que, apresentaram a coloração amarelada/alaranjada, ausência de turbidez, banda plasmônica única com absorbância acima de 1,5 e próxima a 400 nm; o EDS confirmou a presença de prata, sódio, carbono e oxigênio; o DLS apresentou boa polidispersão e tamanho esperado de  $30 \pm 10$  nm; o MET apresentou morfologia esférica e distribuição de tamanho na escala nanométrica; o DRX confirmou a natureza cristalina das NPs; o PZ demonstrou boa estabilidade ( $\leq -30$ mV) e o NTA confirmou a distribuição de tamanho dentro da nanoescala. Para avaliação antitumoral (10, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ g/mL de AgNPs) os seguintes experimentos foram realizados: impedância elétrica, migração, MTT, LDH e anexina V/PI. Ambos os lotes de AgNPs não alteraram a adesão e proliferação celular. Por outro lado, houve redução significativa da atividade mitocondrial da A549 exposta ao lote 02 e 05 após 48h nas concentrações de 100  $\mu$ g/mL, mantendo-se após 72h com IC50 de, respectivamente, 77,68 e 77,61. Para a BEAS-2B lote 02 reduziu nas concentrações de 75 e 100  $\mu$ g/mL, mantendo-se constante após 72 horas com IC50 de 77,99  $\mu$ g/mL, enquanto para o lote 05, a redução significativa ocorreu em 100  $\mu$ g/mL após 48 horas e, não se manteve após 72 h, indicando possível toxicidade seletiva. Para A549, não ocorreu o extravasamento de LDH, indicando possível morte por apoptose que, foi confirmada por anexina V/PI em ambos os lotes. Além disso, não foi possível identificar alteração no potencial migratório. Portanto, nossos resultados contribuem para a discussão sobre o uso de AgNPs como nanomedicamentos para formulação e/ou aprimoramento da terapia contra o câncer de pulmão, além de auxiliar na promoção da qualificação de nanomateriais.

**Palavras-chave:** Câncer de pulmão; nanopartículas de prata; atividade antitumoral.

## ABSTRACT

Lung cancer is a global public health issue due to its high incidence, prevalence, and mortality rates. Silver nanoparticles (AgNPs) exhibit antitumor activity and hold promise in mitigating adverse effects and drug resistance associated with conventional treatments. However, there are gaps to be addressed, such as the mechanisms of antitumor action, stability in biological environments, and potential cytotoxicity to healthy tissues. Therefore, the aim of this study was to synthesize and characterize AgNPs using different chemical synthesis protocols, followed by evaluating their antitumor potential in lung cancer cell lines (A549) and cytotoxic effects on non-tumoral lung cell lines (BEAS-2B). Eight batches of AgNPs were synthesized, with two (batches 02 and 05) selected based on exclusion criteria (coloration, turbidity, and UV-visible) and characterization (TEM, XRD, ZP, EDS coupled with SEM, and NTA). Ultimately, two batches of AgNPs (02 and 05) were chosen, as they exhibited yellow/orange coloration, absence of turbidity, unique plasmonic band with absorbance above 1.5 and close to 400 nm; EDS confirmed the presence of silver, sodium, carbon, and oxygen; DLS showed good polydispersion and expected size of  $30 \pm 10$  nm; TEM revealed spherical morphology and size distribution in the nanoscale; XRD confirmed the crystalline nature of the NPs; ZP demonstrated good stability ( $\leq -30$ mV), and NTA confirmed size distribution within the nanoscale. For antitumor evaluation (10, 25, 50, 75, and 100  $\mu\text{g/mL}$  of AgNPs), the following experiments were conducted: electrical impedance, migration, MTT, LDH, and annexin V/PI. Both batches of AgNPs did not alter cell adhesion and proliferation. However, there was a significant reduction in mitochondrial activity of A549 cells exposed to batches 02 and 05 after 48h at concentrations of 100  $\mu\text{g/mL}$ , maintaining after 72h with IC<sub>50</sub> of 77.68 and 77.61, respectively. For BEAS-2B, batch 02 reduced at concentrations of 75 and 100  $\mu\text{g/mL}$ , remaining constant after 72 hours with IC<sub>50</sub> of 77.99  $\mu\text{g/mL}$ , while for batch 05, significant reduction occurred at 100  $\mu\text{g/mL}$  after 48 hours and did not persist after 72h, indicating possible selective toxicity. LDH leakage did not occur in A549 cells, indicating possible apoptosis, confirmed by annexin V/PI in both batches. Additionally, no alteration in migratory potential was identified. Therefore, our results contribute to the discussion on the use of AgNPs as nanomedicines for lung cancer therapy formulation and/or enhancement, as well as in promoting the qualification of nanomaterials.

**Keywords:** Lung cancer; silver nanoparticles; antitumor activity.

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figuras</b> | <b>Conteúdo</b>  |    |
|----------------|--|----|
| 1              | Marcos históricos da evolução da nanotecnologia.   | 18 |
| 2              | A nanociência e a nanotecnologia com sua interdisciplinaridade pelas áreas fundamentais da ciência e tecnologia. | 20 |
| 3              | Escala de comprimento para referenciar os nanomateriais.   | 21 |
| 4              | Anatomia do sistema respiratório inferior.   | 25 |
| 5              | Citotoxicidade de AgNPs.   | 32 |
| 6              | Síntese de AgNPs protocolo 1.  | 39 |
| 7              | Síntese de AgNPs protocolo 2.  | 39 |
| 8              | Lotes de AgNPs sintetizadas.   | 48 |
| 9              | UV-Visível de todos os 8 lotes de AgNPs.   | 50 |
| 10             | Modificações no espectro sem o uso de estabilizador (PVA) solução 06.  | 51 |
| 11             | Tamanho e PDI de AgNPs em água (ultrapura, Milli-Q).   | 52 |
| 12             | Estabilidade referente a Tamanho e PDI de AgNPs em água (ultrapura, Milli-Q).                                    | 53 |
| 13             | Tamanho e PDI de AgNPs em meios de cultivo DMEM low, high e RPMI.  | 55 |
| 14             | Distribuição populacional de tamanho do lote 02 em água e meios de cultivo.                                      | 56 |
| 15             | Distribuição populacional de tamanho do lote 05 em água e meios de cultivo.                                      | 57 |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 16 | Potencial Zeta (PZ) dos lotes 02 e 05.   | 58 |
| 17 | Distribuição populacional e concentração das AgNPs (02 e 05).                      | 59 |
| 18 | Difratogramas lote 02 e 05 de AgNPs.   | 60 |
| 19 | Tamanho e morfologia de AgNPs (lote 05) por Microscopia Eletrônica de Transmissão. | 61 |
| 20 | Tamanho e morfologia de AgNPs (lote 02) por Microscopia Eletrônica de Transmissão. | 61 |
| 21 | Análise do fator de circularidade/forma das AgNPs lote 05.                         | 62 |
| 22 | Análise do fator de circularidade/forma das AgNPs lote 02.                         | 63 |
| 23 | Frequência de distribuição de tamanho de AgNPs lote 05.                            | 63 |
| 24 | Frequência de distribuição de tamanho de AgNPs lote 02.                            | 64 |
| 25 | Composição química por Energia Dispersiva de Raios X do lote 02.                   | 65 |
| 26 | Composição química por Energia Dispersiva de Raios X do lote 05.                   | 65 |
| 27 | Curva de crescimento A549.   | 67 |
| 28 | Curva de crescimento BEAS-2B.  | 67 |
| 29 | Viabilidade celular A549 por MTT.  | 70 |
| 30 | Concentração inibitória (IC-50) da A549 após exposição com AgNPs.                  | 71 |
| 31 | Viabilidade celular BEAS-2B por MTT.   | 73 |
| 32 | Concentração inibitória (IC50) da BEAS-2B após exposição com AgNPs 02.             | 74 |
| 33 | Viabilidade celular A549 por LDH.  | 75 |
| 34 | Proliferação das células A549 após 24h, 48h e 72h após tratamento                  | 77 |

com AgNPs por impedância elétrica.

|    |  |    |
|----|--|----|
| 35 | Morte celular por anexina V/PI após 72h de exposição com AgNPs.              | 79 |
| 36 | Efeito na migração celular da A549 após 48h e 72h após tratamento com AgNPs. | 81 |

## LISTA DE TABELAS

| <b>Tabela</b> | <b>Conteúdo</b>  |    |
|---------------|--|----|
| 1             | Principais cientistas que contribuíram para a evolução e elucidação da nanotecnologia e nanociência. | 19 |
| 2             | Classes e subclasses da síntese de AgNPs.  | 38 |
| 3             | Dados da síntese de AgNPs.   | 93 |
| 4             | Critérios de exclusão da síntese de AgNPs.   | 40 |
| 5             | Critérios de caracterização da síntese de AgNPs.   | 40 |
| 6             | Concentrações estipuladas para as curvas de crescimento.   | 44 |
| 7             | Critérios de exclusão preenchidos.   | 50 |
| 8             | Critérios de caracterização preenchidos.   | 66 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| AgNPs             | Nanopartículas de Prata                                      |
| °C                | Celsius  |
| µg                | micrograma   |
| Å                 | Ångström   |
| A549              | Células Epiteliais Basais Humanas de Adenocarcinoma Alveolar |
| Ag <sup>+</sup>   | Íons de prata  |
| AgNO <sub>3</sub> | Nitrato de Prata   |
| AKT               | Proteína quinase B   |
| ALK               | Anaplastic Lymphoma Kinase                                   |
| BEAS-2B           | Células Epiteliais Brônquicas Humanas                        |
| BRAF              | B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase                |
| CCNP              | Carcinoma de Células Não Pequenas                            |
| CCP               | Carcinoma de Células Pequenas                                |
| CO <sub>2</sub>   | Gás Carbônico  |
| d nm              | diâmetro médio   |
| DL                | DMEM low glucose   |
| DLS               | Espalhamento de Luz Dinâmico                                 |
| dm                | decímetro  |
| DMEM              | Dulbecco's Modified Eagle Medium                             |
| DNA               | Ácido desoxirribonucleico                                    |
| DO                | Densidade Óptica   |
| DRX               | Difração de Raios-X  |
| EDS               | Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X              |
| EGFR              | Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico                  |
| GLOBOCAN          | Global Cancer Observatory                                    |
| IARC              | International Agency for Research on Cancer                  |
| IC                | Índice Celular   |
| INCA              | Instituto Nacional do Câncer                                 |
| ISO               | Organização Internacional de Normalização                    |
| KRAS              | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog                   |
| LDH               | Lactato Desidrogenase  |

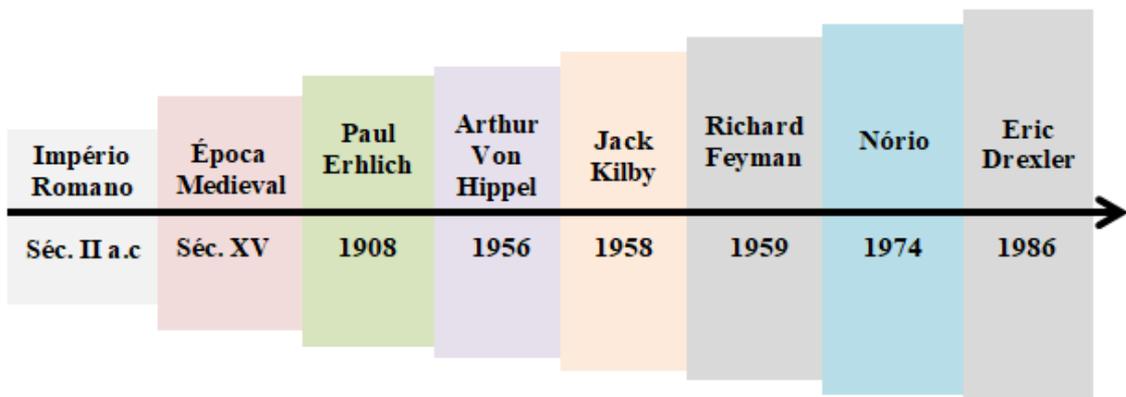
|                   |   |
|-------------------|---|
| m                 | metro   |
| MEC               | Matriz Extracelular                                       |
| MET               | Microscopia Eletrônica de Transmissão                     |
| MEV               | Microscopia Eletrônica de Varredura                       |
| mg                | Miligrama   |
| min               | minutos   |
| mL                | mililitro   |
| mm                | milímetro   |
| mol               | molar   |
| mTOR              | Alvo da rapamicina em mamíferos                           |
| MTT               | 3-4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide   |
| NaBH <sub>4</sub> | Borohidreto de Sódio                                      |
| NM                | Nanomaterial  |
| nm                | nanômetro   |
| NP                | Nanopartículas  |
| NTA               | Análise de Rastreamento de nanopartículas                 |
| O <sub>2</sub>    | Gás Oxigênio  |
| OECD              | Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico |
| PBS               | Solução Salina Tamponada com Fosfato                      |
| PDI               | Índice de Polidispersão                                   |
| pH                | Potencial hidrogeniônico                                  |
| PI                | Iodeto de Propídeo  |
| PI3K              | Fosfatidilinositol 3-quinase                              |
| PIK3CA            | Gene codificante da subunidade catalítica alfa da PI3K    |
| PS                | Solução de Penicilina Estreptomicina                      |
| PTEN              | Gene supressor tumoral negativo da via PI3K/AKT/mTOR      |
| PVA               | Álcool Polivinílico                                       |
| PZ                | Potencial Zeta  |
| ROS               | Espécies Reativas de Oxigênio                             |
| ROS1              | C-ros oncogene 1  |
| RPMI              | Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute           |
| SFB               | Soro Fetal Bovino   |
| SI                | Sistema Internacional de Unidades                         |

|               |  |
|---------------|--|
| STM           | Microscópio de Corrente de Tunelamento   |
| TC            | Tomografia Computadorizada               |
| TP53          | Tumor Protein p53                        |
| TSC           | Citrato Trissódico                       |
| UA            | Absorbância                              |
| VEGF          | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| $\mu\text{L}$ | microlitro                               |
| $\mu\text{m}$ | micrometro                               |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Desenvolvimento da nanotecnologia e nanociência

A Nanotecnologia consolidou uma dinâmica de rápido desenvolvimento e aplicação diversificada em virtualmente todos os setores econômicos, sendo uma realidade observada em inúmeros produtos comercializados (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023). Segundo dados recentes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), prevê-se que o mercado de produtos nanotecnológicos movimentará cerca de 350 milhões de dólares até 2024, estimando-se um crescimento que ultrapasse 1 bilhão de dólares em 2030 (OECD, 2023). No entanto, apesar do termo "rápido" ser frequentemente utilizado para descrever o surgimento e avanço dessa nova área, é crucial reconhecer um histórico que remonta desde a época medieval até os dias atuais, demonstrando uma evolução exponencial da nanotecnologia, conforme exemplificado na figura 1.



**Figura 1. Marcos históricos da evolução da nanotecnologia:** demonstração de que a nanotecnologia já vem sendo discutida e estudada há mais de um século por diversos cientistas que contribuíram para o desenvolvimento dessa área na ciência.

O termo nanotecnologia só passou a ser estabelecido no século XX, porém desde o Império Romano (século II a.c) e da época medieval (século XV) já ocorriam à produção de materiais constituídos por nanopartículas que atualmente são denominados como nanomaterias (NM). Esses materiais eram produzidos a base de NPs de ouro e prata como, os vitrais das magníficas igrejas da Europa e as taças (TONET M.D; LEONEL A. et al., 2019). Dessa forma, pode-se observar que séculos antes da ciência nanotecnológica surgir já havia contato direto com essa área.

O estudo da nanotecnologia e nanociência começou a ser verdadeiramente estabelecido e elucidado a partir do conjunto de ideais de alguns cientistas que foram essenciais. Mas, como

toda descoberta, sempre há o que se denomina como “pai” ou “o criador” dessa nova ciência. Baseado nisso, o cientista que ficou conhecido como “pai” da nanotecnologia e nanociência foi o Richard Feynman que em 1959 realizou sua famosa palestra intitulada: “*There is plenty of room at the bottom*” (Há mais espaços lá embaixo)(BENSAUDE-VINCENT; SIMON, 2019), no qual dizia que em um futuro não muito distante seria possível desenhar e construir materiais átomo-a-átomo, molécula-a-molécula por manipulação controlada e organizada (MARQUES, 2014).

Como citado anteriormente, a palestra realizada por Feynman foi baseada no conjunto de estudos feitos por outros cientistas que também são considerados marcantes no desenvolvimento da nanotecnologia. Dentre esses, destacaram-se cinco grandes pesquisadores: Paul Erhlich, Arthur Von Hippel, Jack Kilby, Nório Taniguchi e Eric Drexler.

A tabela 1 abaixo destaca cada um desses pesquisadores e como suas participações foram pontuais e fundamentais para o que hoje denominamos de nanociência e nanotecnologia.

**Tabela 1. Principais cientistas que contribuíram para a evolução e elucidação da nanotecnologia e nanociência.**

| <b>Cientistas</b>        | <b>Ano</b> | <b>Contribuições</b>   |
|--------------------------|------------|--|
| <b>Paul Erhlich</b>      | 1908       | Miniaturização de nanopartículas com o intuito de produzir sistemas de <i>drug delivery</i> (ganhador do prêmio Nobel de medicina).  |
| <b>Arthur Von Hippel</b> | 1956       | Publicação do artigo intitulado “ <i>Molecular Engineering</i> ” que remonta a ideia da produção de matérias a partir de moléculas e átomos.   |
| <b>Jack Kiby</b>         | 1958       | Miniaturização de componentes eletrônicos como resistores e capacitadores em um pequeno pedaço de silicone (ganhador do prêmio Nobel de física).   |
| <b>Nório Taniguchi</b>   | 1974       | Consolidou o uso do termo nanotecnologia e definiu como o processo de separação, consolidação e deformação de materiais por moléculas e átomos a partir do artigo “O conceito básico da nanotecnologia”. |
| <b>Eric Drexler</b>      | 1986       | Publicação do Livro “ <i>Enginer of Creation</i> ”.  |

**Legenda:** Alguns cientistas foram necessários para o desenvolvimento dessa área; no entanto, alguns ganharam destaque, como os citados acima, devido às suas contribuições certas para esse campo. Fonte: Adaptado de TONET M.D; LEONEL A. et al., 2019.

Além das contribuições teóricas desenvolvidas por esses diversos cientistas, um dos fatores primordiais para o desenvolvimento de uma nova área de estudo científico está ligado a capacidade de colocar a teoria em prática e, isso se tornou possível com a produção do Microscópio de Corrente de Tunelamento (STM, do inglês Scanning Tunneling Microscope) em 1981 que, permitiu a visualização dos átomos individualizados, comprovando dessa forma, que era possível realizar a produção de nanoestruturas a partir da manipulação dos átomos (ideia desenvolvida por Arthur Von Hippel e Feynman) (TONET M.D; LEONEL A. et al., 2019).

A partir do ano de 1986 a nanotecnologia passou a atuar não só como influência científica como também socioeconômica, visto que o estudo dessa área começou a ser adicionado nas grades curriculares das escolas/universidades e grandes indústrias começaram a se aprofundar e realizar cada vez mais a produção de NM. Além disso, a nanotecnologia e a nanociência são conhecidas pela sua alta interdisciplinaridade servindo como mais uma justificativa do seu aumento em ambientes escolares e acadêmicos (Figura 2) (MARQUES, 2014; SRINIVAS, 2014).



**Figura 2. A nanociência e a nanotecnologia com sua interdisciplinaridade pelas áreas fundamentais da ciência e tecnologia:** representação da convergência entre várias áreas que compõem grande parte do quadro científico, demonstrando e, conseqüentemente, justificando o grande crescimento desse setor. Fonte: adaptado de TONET M.D; LEONEL A. et al., 2019.

Destacando como exemplo o cenário brasileiro, pode-se observar que esse estímulo nas universidades, escolas e indústrias chegaram tardiamente e começaram a ser colocadas em prática apenas a partir de 2006, deixando várias divergências no que toca a produção e exposição a esses NM (BRASIL, 2006, p.56).

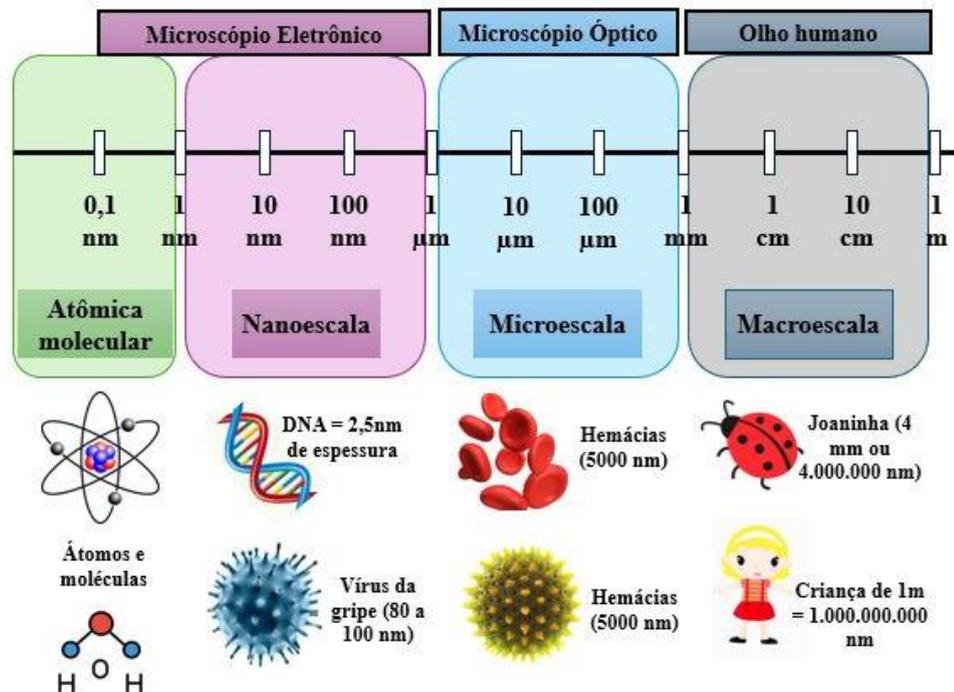
Vale destacar também, que a nanociência e a nanotecnologia estão diretamente

relacionadas, gerando uma correlação entre esses dois setores. A diferença está no fato de que a nanociência se trata do estudo dos átomos e moléculas, já a nanotecnologia estuda como aplicar esses átomos e moléculas para produzir produtos considerados reprodutíveis e úteis para diversos setores econômicos (RAFIQUE et al., 2020).

## 1.2 Nanopartículas e a Nanotecnologia

### 1.2.1 Definições, peculiaridades e aplicabilidades

Nanopartículas são átomos/moléculas que se encontram na escala denominada como nanoescala. O prefixo “nano” tem origem etimológica grega do termo *nannos* e significa “homem muito baixo” (SUDHA et al., 2018). Este prefixo denota dimensões físicas que se situam na ordem de um bilionésimo de qualquer unidade de medida, exemplificado pelo nanômetro (nm), adotado como unidade padrão na nanotecnologia, equivalendo a  $10^{-9}$  metros (m) no Sistema Internacional de Unidades (SI, do francês: *Système international d’unités*) (SIZE OF THE NANOSCALE | NANO.GOV, s.d.). A Figura 3 exibe uma escala de comprimento que proporciona referenciar às dimensões diminutas dos NM em comparação com macromateriais e micromateriais, incluindo sub-materiais de escala inferior ao nanômetro.



**Figura 3. Escala de comprimento para referenciar os nanomateriais.** representação de materiais com tamanhos correspondentes aos macro (milímetro, centímetro e metro), micro (micrômetro), nano (nanômetro) e sub-materiais (ângström).

A etimologia da palavra "tecnologia," originada do grego "téchnē" (arte ou habilidade) e "logia" (estudo ou conhecimento), delinea sua definição como o estudo e a aplicação prática do conhecimento. Este conceito transcende diversas áreas, incluindo a nanotecnologia, na qual se destaca a aplicação de nanopartículas para a produção de NM reprodutíveis em vários setores socioeconômicos (ANTUNES FILHO; BACKX, 2020; SINGH et al., 2021).

Em termos normativos, a Organização Internacional de Normalização (ISO, do inglês: *International Organization for Standardization*) define nanopartículas como partículas com dimensões externas na escala nanométrica, ou seja, entre 1 e 100 nanômetros e, nanotecnologia como a aplicação da ciência, engenharia e tecnologia para manipular e controlar a matéria em uma escala nanométrica. Em conjunto, definem NM como um material com qualquer dimensão externa em nanoescala ou possuindo estrutura interna ou estrutura de superfície em nanoescala, na faixa de tamanho de 1 a 100 nm (ISO - ISO/TS 80004-2:2015 - NANOTECHNOLOGIES — VOCABULARY — PART 2: NANO-OBJECTS, 2015). De maneira complementar a ISO, a OECD delinea NM como um material que contém partículas, em uma forma não-aglomerada ou aglomerada, onde 50% ou mais das partículas em número, têm pelo menos uma dimensão externa na escala de nanômetros, ou seja, entre 1 e 100 nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011, p. 39).

Embora a nanotecnologia ofereça diferentes possibilidades de aplicação, uma considerável parcela da população não está ciente de que algumas nanopartículas podem ser sintetizadas para fins nanotecnológicos, enquanto outras são naturalmente presentes no meio ambiente ou resultam de reações metabólicas em organismos vivos. Portanto, é crucial discernir que nem toda estrutura ou molécula na escala nanométrica pode ser categorizada como nanotecnologia (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019)

Dentre as nanopartículas utilizadas para fins nanotecnológicos para a produção de diversos NM, pode-se destacar as nanopartículas metálicas, como ouro e prata, que lideram as aplicações biomédicas, sendo essenciais em diagnóstico por imagem, terapia fototérmica e tratamentos contra o câncer (LEOPOLDO; VECHIO, 2020). Além disso, as nanopartículas poliméricas, notadamente as biodegradáveis, são fundamentais na medicina, destacando-se na entrega controlada de medicamentos e em sistemas de liberação prolongada (ATHIRA TR; K SELVARAJU; NL GOWRISHANKAR, 2023). Por outro lado, o grafeno, uma forma de carbono, assume o protagonismo em eletrônica avançada, materiais compósitos e aplicações biomédicas (PRIYA SWETHA; MANISHA; SUDHAKARAPRASAD, 2018). Finalmente, lipossomas e micelas, representantes das nanopartículas lipídicas, exercem uma função vital em formulações farmacêuticas, viabilizando uma entrega eficaz de medicamentos, terapia genética

e imunoterapia (NEVES et al., 2021). Portanto, há diferentes tipos de nanopartículas e, como consequência, há uma grande variabilidade de aplicações (MELO et al., 2020; HAROON ANWAR, 2018).

Essa aplicabilidade do setor nanotecnológico se deve ao fato de que os NM podem ser considerados peculiares quando comparados a outro tipo de produto, devido às suas características físico-químicas alteradas em relação ao seu material de origem em uma escala maior, ou seja, não pertencente à nanoescala. Isso ocorre devido a um fenômeno denominado de efeitos quânticos ou efeitos de tamanho, compostos por alterações que ocorrem no tamanho e na superfície desses NM (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019). Vale salientar que o tipo de nanopartícula, ou seja, se esta provém de um material composto por ouro, prata, entre outros, também está diretamente relacionado às alterações que esses NM irão apresentar (MELO et al., 2020).

Esses fenômenos quânticos induzem modificações nas propriedades eletrônicas, mecânicas, térmicas e ópticas do nanoproduto, além de influenciarem a relação entre superfície e volume (LOOS, 2014; CHEN; YAMADA, [s.d]). Tal influência se manifesta no aumento significativo da superfície, decorrente das numerosas unidades individuais de nanopartículas em comparação com o volume total, resultando em uma considerável ampliação na reatividade e interatividade com diversas moléculas, incluindo aquelas presentes em meio biológico, intensificando, assim, a interação celular (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019). Por esse motivo, aplicações biomédicas ganham destaque, principalmente com o uso de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de prata, para o tratamento do câncer (KHURSHEED et al., 2022).

### **1.3 Câncer**

O câncer é caracterizado pelo crescimento anormal de células, impulsionado por alterações na expressão genética que resultam na desregulação da proliferação e morte celular (SETHI, 2021). As células cancerosas exibem uma reprodução acelerada, formando tumores malignos, aglomerados de células agressivas e incontroláveis (RASHID, 2017). Essas células não respondem aos sinais que normalmente controlam o comportamento celular, continuando a crescer e se dividir de maneira descontrolada. Elas invadem tecidos e órgãos normais e, eventualmente, se disseminam pelo corpo por meio dos sistemas circulatório ou linfático, um processo conhecido como metástase (BERGERS; FENDT, 2021).

A metástase se inicia com as células cancerígenas adquirindo a capacidade de invadir o

tecido circundante, rompendo a membrana basal que confina o epitélio. Essas células tumorais, então, penetram nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, alcançando o lúmen desses vasos. Sobrevivendo ao transporte através desses vasos, as células cancerosas saem da corrente sanguínea ou linfática e se organizam em pequenos aglomerados que proliferam no microambiente de um novo tecido (PITREZ, F. A. B. et al., 2023). Esse processo complexo é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer (ZHANG et al., 2018). Para o crescimento tumoral e o desenvolvimento da metástase, é fundamental o recrutamento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, realizado por meio da angiogênese. Portanto, os tumores liberam fatores e citocinas para induzir a formação de novos vasos, atendendo às suas necessidades nutricionais e de oxigênio. Esse processo de neovascularização pode, por fim, facilitar a metástase (SAMAN et al., 2020; BIELENBERG; ZETTER, 2015).

### **1.3.1 Epidemiologia Global e nacional**

Devido à extensa diversidade de células humanas, diversos tipos de câncer podem ser acometidos. O impacto global do câncer em 2020, conforme estimativas do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) elaboradas pela International Agency for Research on Cancer (IARC), indicou a ocorrência de 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, que totalizaram 18,1 milhões. O câncer de mama feminina liderou como o tipo mais incidente globalmente, com 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido pelo câncer de pulmão, com 2,2 milhões (11,4%). Outros tipos significativos incluíram câncer de cólon e reto, com 1,9 milhão (10,0%); câncer de próstata, com 1,4 milhão (7,3%); e câncer de pele não melanoma, com 1,2 milhão (6,2%) de novos casos (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2022).

Adentrando em nível nacional, a estimativa para cada ano no Brasil do triênio 2023-2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%). Em termos de distribuição de incidência regional, o sul e sudeste possuem maior relevância, visto que equivale a 70% dos casos de câncer em território nacional (INCA, 2020).

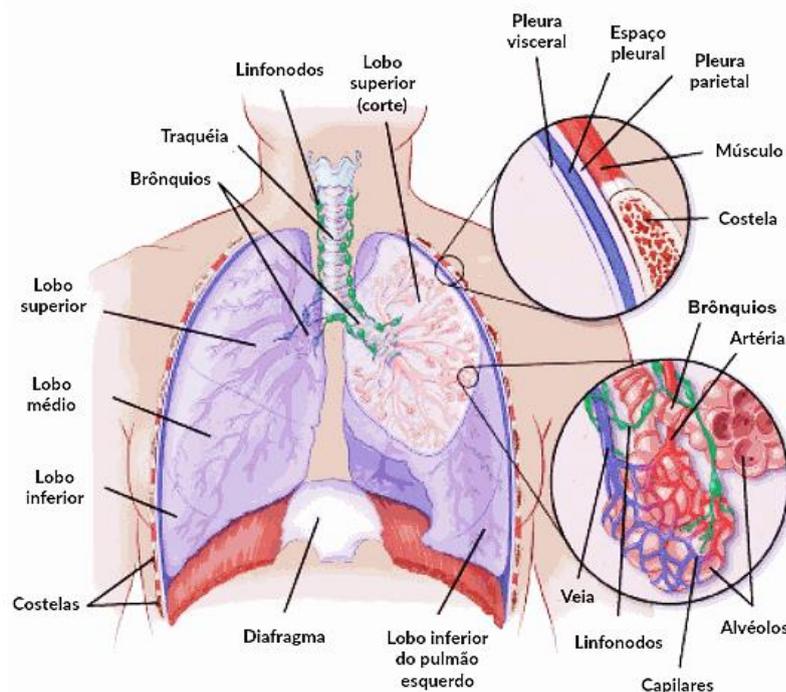
A alta incidência e prevalência global associadas a uma elevada mortalidade (uma morte a cada seis pessoas está relacionada ao câncer) não são os únicos fatores que fazem do câncer um alvo exponencial de crescimento de estudo e pesquisa (INCA, 2020). Há outros entendimentos que precisam ser levantados: cerca de 70% das mortes por câncer ocorrem em

países de baixa e média renda; há uma apresentação tardia e o diagnóstico e tratamento são inacessíveis ou ineficazes e o impacto econômico causado pelo câncer é significativo e recorrente com gastos em média de 1,16 trilhões de dólares anuais (OPAS, 2018).

Todos esses fatos associados contribuem na construção dos caminhos necessários para diminuir essa carga global do câncer. Para isso, há a necessidade de uma análise crítica e aumento de estudos acerca da prevenção, melhoria no diagnóstico para uma detecção precoce mais eficaz e inovações em tratamentos (POMPEU et al., 2021).

### 1.3.2 Câncer de pulmão

O pulmão, é um órgão vital do sistema respiratório humano, apresentando uma estrutura anatômica complexa que desempenha um papel crucial na troca gasosa e na manutenção da homeostase do organismo (HADDAD; SHARMA, 2020). O trato respiratório se divide em superior (cavidade nasal, faringe e laringe) e inferior (traqueia, pulmões, brônquios, bronquíolos e alvéolos), sendo o último (inferior) representado pela Figura 4 abaixo (DE MATTES, 2017). No organismo humano, há dois pulmões, o direito com três lobos e o esquerdo com dois. Além de servirem como via de passagem para o ar, as estruturas respiratórias aquecem, umedecem e filtram o ar antes de atingir os alvéolos (MCKLEROY; LYN-KEW, 2018).



**Figura 4. Anatomia do sistema respiratório inferior:** representação da integração entre as estruturas do sistema respiratório e anatomia pulmonar. Dentre essas estruturas estão: traqueia, brônquios, bronquíolos, lobos, costelas, diafragma, pleura, alvéolos e capilares.

A estrutura dos alvéolos compreende células endoteliais dos capilares, pneumócitos tipo I, pneumócitos tipo II, líquido intersticial e macrófagos alveolares. Cada alvéolo é revestido por uma única camada de epitélio, constituída por dois tipos de células epiteliais: pneumócitos tipo I e tipo II. Os pneumócitos tipo I predominam e formam a superfície alveolar para a troca gasosa, enquanto os pneumócitos tipo II estão localizados nas bordas entre alvéolos adjacentes, desempenhando o papel de sintetizar e secretar surfactante (RUARO et al., 2021; SILVERTHORN, 2017).

Além de produzir surfactante, as células alveolares epiteliais do tipo II desempenham papéis fundamentais na manutenção da função pulmonar e da homeostase, expressando moléculas imunes e participando na restauração de alvéolos danificados. Esse tipo celular é amplamente investigado em estudos *in vitro*, visando compreender os mecanismos fisiopatológicos de doenças pulmonares, tal qual o câncer de pulmão (RUARO et al., 2021).

O câncer de pulmão é uma neoplasia complexa e multifatorial, associada a uma interação entre fatores genéticos e ambientais. O tabagismo permanece como o fator de risco significativo para o câncer de pulmão, onde os carcinógenos presentes na fumaça do cigarro, como benzo(a)pireno, induzem danos genéticos cumulativos, desencadeando mutações oncogênicas. A exposição passiva ao tabaco, especialmente em ambientes fechados, também é um fator de risco reconhecido. Além disso, a exposição ocupacional a carcinógenos, como asbestos, sílica e radônio, contribui para essa suscetibilidade (CONTOH et al., 2019; BREY et al., 2020).

Os fatores genéticos também desempenham um papel crucial na predisposição ao câncer de pulmão, com variantes genéticas associadas a mutações em genes específicos que regulam o crescimento celular, reparo do DNA (ácido desoxirribonucleico), apoptose e outras funções celulares fundamentais (WANG et al., 2017). Além disso, a poluição do ar, que inclui poluentes atmosféricos como material particulado e compostos orgânicos voláteis, emerge como um fator de risco ambiental relevante (BREY et al., 2020).

Os principais tipos de câncer de pulmão são classificados com base nas características histológicas. As duas categorias principais são: Carcinoma de Células Não Pequenas (CCNP) e Carcinoma de Células Pequenas (CCP), no qual dentro da categoria CCNP a outras subdivisões, tais quais: o adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (WU et al., 2021; PARKER et al., 2022).

O adenocarcinoma é o tipo mais comum de câncer de pulmão e frequentemente ocorre em não fumantes. Geralmente, desenvolve-se nas extremidades mais distantes dos pulmões e pode estar associado a determinadas mutações genéticas, como o EGFR (Receptor do Fator de

Crescimento Epidérmico). O carcinoma de células escamosas origina-se nas células escamosas que revestem as vias aéreas, sendo diretamente relacionado ao tabagismo, podendo ocorrer no centro dos pulmões, próximo aos brônquios (WU et al.,2021). Já a categoria CCP é menos comum e está associada ao tabagismo, sendo definida pelo crescimento rápido e, por consequência, espalha-se precocemente para outras partes do corpo (RIGHI L, VOLANTE M, PAPOTTI M., 2022).

Por ser uma neoplasia complexa e com diferentes categorias, a fisiopatologia abrange uma série de eventos moleculares, celulares e microambientais. Em grande parte, associado ao tabagismo e exposição a carcinógenos, o câncer de pulmão inicia-se com danos ao DNA de células epiteliais pulmonares, desencadeando mutações genéticas (CONTOH et al., 2019; BREY et al., 2020).

Essas mutações tendem a afetar genes cruciais, como o KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e o TP53 (*tumor protein p53*), desencadeando, respectivamente, vias de sinalização aberrantes que promovem a proliferação celular descontrolada e danos na regulação do ciclo celular e na resposta à apoptose. Tal cenário propicia o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas, incluindo displasia e carcinoma *in situ*, marcando uma fase crítica na progressão do câncer de pulmão (SKOULIDIS; HEYMACH, 2019).

O envolvimento do EGFR é proeminente nesse estágio e, constantemente é mutada em pacientes com câncer de pulmão. À medida que as mutações se acumulam, as células tumorais adquirem a capacidade de evadir da morte celular por apoptose, evitam respostas imunológicas e desenvolvem habilidades metastáticas, progredindo para um estágio invasivo (SKOULIDIS; HEYMACH, 2019).

O microambiente tumoral desempenha um papel significativo na fisiopatologia, visto que, as células tumorais interagem com componentes da MEC e células estromais. Essa interação promove a angiogênese, no qual, fatores angiogênicos, especialmente o VEGF, são secretados pelas células tumorais, promovendo o desenvolvimento vascular, fornecendo assim, os nutrientes essenciais para o crescimento tumoral (EMON et al., 2018; WEI et al., 2020).

A formação de metástases é facilitada pela invasão local e disseminação pelo sistema linfático e sanguíneo. A expressão aumentada de moléculas de adesão e metaloproteinases, juntamente com a capacidade de evadir do sistema imunológico, contribui para a disseminação metastática, estabelecendo um estágio crítico da progressão tumoral (EMON et al., 2018; WEI et al., 2020).

Dependendo da progressão/estágio, os sinais e sintomas são variados. O estágio inicial é demarcado pela presença de sintomas não específicos, o que contribui para a detecção tardia

e desafios no tratamento. No entanto, à medida que a doença progride, diversos sinais e sintomas podem se manifestar (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2023).

Um dos primeiros indícios relatados é a tosse persistente, que pode variar de seca a produtiva com expectoração sanguinolenta, indicando possíveis lesões nos tecidos pulmonares. A dispneia, ou dificuldade respiratória, é outra manifestação comum, resultante da obstrução do fluxo de ar devido ao crescimento tumoral ou ao acúmulo de fluido nos pulmões (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2023).

A dor no peito, muitas vezes localizada na região torácica, pode surgir à medida que o tumor invade estruturas adjacentes ou comprime nervos. A perda de peso inexplicada e a fadiga persistente são sintomas sistêmicos que acompanham o avanço do câncer de pulmão, refletindo a demanda metabólica aumentada e os efeitos do processo tumoral no organismo. Outros sinais específicos podem incluir rouquidão, resultado de envolvimento do nervo laríngeo recorrente, e infecções respiratórias frequentes devido à comprometimento do sistema imunológico. Ademais, manifestações paraneoplásicas, como síndrome de Horner e hipercalcemia, são observadas em alguns casos, destacando a diversidade de apresentações clínicas associadas ao câncer de pulmão (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2023).

Esses sinais e sintomas são fundamentais para o diagnóstico. No entanto, torna-se necessário uma abordagem abrangente, integrando técnicas avançadas de imagem, avaliação histopatológica e, cada vez mais, a aplicação de biomarcadores moleculares. A complexidade do processo diagnóstico reflete a diversidade de subtipos histológicos e características moleculares que influenciam a abordagem terapêutica (NOORELDEEN; BACH, 2021; HARÐARDOTTIR H. et al., 2022).

A avaliação inicial inclui métodos de imagem, como radiografia de tórax e tomografia computadorizada (TC), que são fundamentais para identificar lesões suspeitas, sua localização e extensão. Imagens de alta resolução proporcionam detalhes que auxiliam na determinação do estágio da doença e na elaboração de estratégias terapêuticas adequadas (NOORELDEEN; BACH, 2021; HARÐARDOTTIR H. et al., 2022).

A confirmação histopatológica por meio de biópsias é essencial para determinar o tipo histológico do câncer de pulmão. A broncoscopia, biópsias percutâneas e procedimentos cirúrgicos são métodos comuns para obtenção de amostras. A análise histológica detalhada permite classificar o câncer em subtipos, como carcinoma de células pequenas e não pequenas, cada um com implicações específicas no manejo clínico. A incorporação de biomarcadores moleculares, permitem a identificação de mutações em genes como EGFR, ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), ROS1(*c-ros oncogene 1*) e BRAF (*B-Raf proto-oncogene*,

*serine/threonine kinase*), ocasionando uma abordagem mais personalizada, direcionando terapias-alvo específicas. Em suma, pode-se observar que o diagnóstico do câncer de pulmão inclui uma abordagem integrativa para fornecer um diagnóstico preciso, permitindo uma intervenção terapêutica mais eficaz e personalizada (NOORELDEEN; BACH, 2021; HARDARDOTTIR H. et al., 2022).

Após realizar o diagnóstico, e caso o paciente apresente câncer de pulmão, o tratamento precisa ser estipulado de acordo com a individualidade clínica apresentada pelo paciente (tipo histológico e estágio da doença). As modalidades terapêuticas que podem ser utilizadas incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapias-alvo (NOORELDEEN; BACH, 2021; HARDARDOTTIR H. et al., 2022).

Dentre esses tratamentos, a cirurgia, radioterapia e quimioterapia estão entre os tratamentos convencionais mais realizados. A cirurgia é comumente considerada para pacientes com câncer de pulmão em estágio inicial, quando o tumor é localizado e pode ser removido cirurgicamente. Procedimentos como lobectomia (remoção de um lobo do pulmão) ou pneumonectomia (remoção de um pulmão inteiro) podem ser realizados, visando a remoção completa do tumor (NOORELDEEN; BACH, 2021; HARDARDOTTIR H. et al., 2022).

A quimioterapia envolve o uso de agentes químicos para destruir as células cancerígenas ou impedir seu crescimento. É comumente administrada por via intravenosa e pode ser usada antes ou após a cirurgia, ou como tratamento principal para cânceres avançados. Dentre os quimioterápicos mais utilizados no tratamento no câncer de pulmão está a cisplatina. Esse quimioterápico causa danos ao DNA, inibição da divisão celular e, conseqüentemente, apoptose (TENG et al., 2018).

No entanto, a resistência a terapias convencionais, como a quimioterapia é uma característica desafiadora do câncer de pulmão, relacionada à heterogeneidade tumoral e à ativação de vias de sinalização de sobrevivência celular, como PI3K (Fosfatidilinositol 3-quinase) /AKT (proteína quinase B) /mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), que estão relacionados com a regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência das células cancerígenas (DENG et al., 2023; SANAEI et al., 2022).

Essa via é ativada por uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, hormônios e sinais provenientes do microambiente tumoral. A ativação resulta na fosforilação e ativação da proteína quinase AKT, que por sua vez regula uma série de proteínas e processos celulares, incluindo a expressão de genes relacionados à proliferação celular, sobrevivência, metabolismo e angiogênese (DENG et al., 2023; SANAEI et al., 2022).

O mTOR é uma proteína chave na via PI3K/AKT/mTOR e atua como um regulador

central do crescimento celular, integrando sinais intracelulares e extracelulares para controlar a síntese de proteínas, o metabolismo energético e a proliferação celular. Sua hiperativação tem sido associada à progressão tumoral, resistência terapêutica e pior prognóstico em pacientes com câncer de pulmão (DENG et al., 2023; SANAEI et al., 2022).

A ativação aberrante dessa via pode ocorrer devido a várias alterações genéticas e epigenéticas, incluindo mutações em genes como PIK3CA (que codifica a subunidade catalítica alfa da PI3K), AKT1/2/3 e PTEN (um supressor tumoral negativo da via). Essas mutações podem resultar em uma ativação crônica da via, promovendo o crescimento descontrolado e a sobrevivência das células tumorais (DENG et al., 2023; SANAEI et al., 2022).

Portanto, há um aumento crescente da necessidade de novas terapias que visem melhorar a eficácia terapêutica para o tratamento do câncer de pulmão. Nesse contexto, a nanotecnologia está sendo um setor amplamente utilizado. Dentro desse setor, há uma área responsável pela produção de NM diversos para aplicabilidade no setor médico, denominada de nanomedicina. Dentre os NM produzidos estão aqueles que visam combater o câncer através da melhoria das terapêuticas tradicionais ou do surgimento de novas (EMANUEL C.S. et al, 2021).

Com a utilização desses NM, podem-se reduzir doses e a incidência de efeitos adversos, além de promover a liberação prolongada do fármaco no seu local de ação, aumentar o intervalo entre as doses aplicadas e melhorar a eficácia de obtenção devido ao direcionamento do fármaco aos tecidos doentes, associando também, à proteção simultânea dos tecidos saudáveis (POMPEU et al., 2021).

Todas essas funcionalidades listadas acima irão depender diretamente do tipo de NM produzido e de acordo com a função desejada. Os NM sintetizados podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os orgânicos apresentam diversas vantagens, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixa toxicidade, dentre outros, bem como a utilização de diversas plataformas, como lipossomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros e micelas, que protegem o fármaco contra a degradação, asseguram a liberação controlada, aumentam a biodisponibilidade e reduzem os efeitos adversos. Já os inorgânicos apresentam vantagens como tamanho e morfologia controláveis, propriedades físico-químicas, modificação da superfície dentre outros. Vale destacar que as nanopartículas metálicas e magnéticas se destacam na produção desses NM inorgânicos (EMANUEL C.S. et al, 2021).

Dessa forma, os NM têm sido bastante estudados e aplicados em sistemas para melhorar a ação anticâncer de alguns medicamentos, tornando-se desse modo uma ferramenta muito útil para combate dessa doença.

#### 1.4 Aplicação de nanopartículas de prata no tratamento de câncer

As nanopartículas de prata representam uma área de significativo interesse na nanotecnologia e têm sido amplamente exploradas em diversos campos de aplicação, destacando-se notavelmente em setores como a nanomedicina para aplicação antitumoral (BEHZADI, S. et al., 2018). É sabido a partir de estudos originados pela nanotoxicologia, que as interações que ocorrem entre as nanopartículas e células animais são muito mais complexas e diferentes da interação com a mesma substância em maior escala. Essa diferença está focada nas numerosas características físico-químicas que essas nanopartículas podem apresentar e, por isso, o significado de dose toxicológica para a nanotecnologia irá levar em considerações essas diferenças peculiares. Dentre essas estão: maleabilidade, flexibilidade, elevada condutibilidade elétrica e térmica, atividade catalítica; ação antimicrobiana frente a bactérias, vírus, fungos e protozoários (DURÁN et al., 2019).

Essas características físico-químicas estão diretamente associadas a interação celular e, por consequência, as respostas celulares frente a essa interação (CARLSON et al., 2008; ILIĆ et al., 2021). A maleabilidade e flexibilidade dessas nanopartículas, embora não sejam diretamente envolvidas na interação celular, desempenham um papel crucial no design de formulações que visam uma entrega precisa de agentes terapêuticos às células-alvo (GOLÇALVES S., 2020). A elevada condutibilidade elétrica e térmica dessas nanopartículas destaca-se em terapias fototérmicas, onde a absorção de luz resulta em danos seletivos às células cancerígenas (KIM et al., 2021).

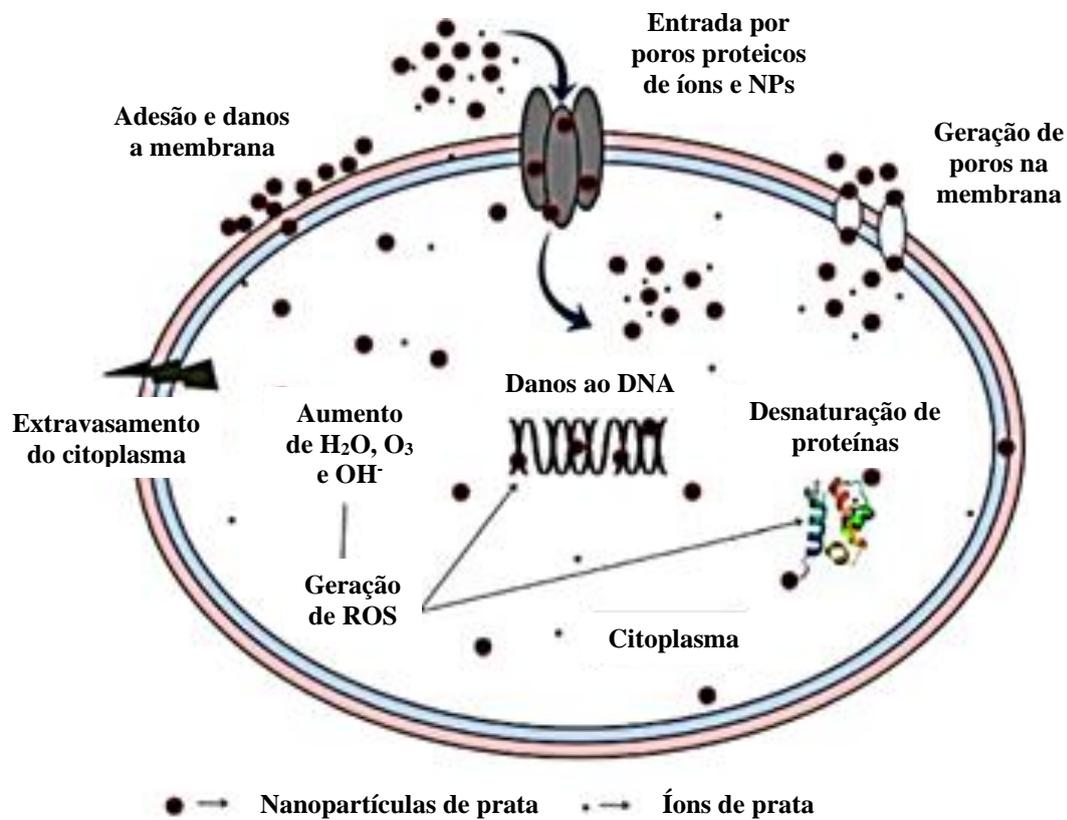
A atividade catalítica das nanopartículas de prata pode influenciar a modulação de reações bioquímicas intracelulares, apresentando implicações em estratégias terapêuticas direcionadas. Além disso, a ação antimicrobiana, embora inicialmente explorada para prevenir infecções secundárias, também desempenha um papel na interação com células, especialmente em ambientes tumorais que apresentam complexidade microbiológica (BRUNA et al., 2021).

As características de tamanho, forma e carga superficial, são determinantes na interação com membranas celulares e processos endocíticos. O tamanho das partículas influencia a internalização celular, enquanto a carga superficial pode afetar a afinidade com membranas carregadas eletricamente. A relação área de superfície/volume, comum em nanoescalas, aumenta a reatividade e a interação dessas nanopartículas com componentes celulares (CARLSON et al., 2008; ILIĆ et al., 2021).

Estudos indicam que a funcionalização de nanopartículas de prata pode modular especificamente sua interação com receptores celulares, permitindo uma abordagem

direcionada em terapias antitumorais. Essa capacidade de funcionalização também contribui para a estabilidade coloidal, garantindo que as nanopartículas mantenham suas propriedades ao longo do processo de administração (NASIR A. et al., 2021).

Focalizando na toxicidade das nanopartículas de prata diante da interação com células animais, evidencia-se seu potencial antitumoral por meio de uma gama abrangente de respostas celulares. Incluem-se nesse escopo fenômenos como estresse oxidativo, resposta inflamatória, modificações moleculares, alterações no DNA, inibição de crescimento, ruptura mitocondrial e modificações morfológicas como pode ser representado na figura 5 abaixo. (REZVANI, 2019).



**Figura 5. Citotoxicidade de AgNPs:** respostas celulares frente a interação com AgNPs, tais quais: estresse oxidativo, resposta inflamatória, modificações moleculares, alterações no DNA, inibição de crescimento, ruptura mitocondrial e modificações morfológicas. Fonte: Adaptado REZVANI, 2019.

Vale ressaltar que, na maioria dos casos a toxicidade é gerada pela combinação dos fatores listados acima. Além disso, não são todos os tipos celulares que frente a esse contato irão expor essas respostas celulares, ou seja, o tipo de célula também é um fator determinante na toxicidade pelas AgNPs. Já foram relatados efeitos em células de linfoblastos, câncer de próstata, endotélio umbilical, células de câncer sanguíneo, dentre outras (REZVANI, 2019).

O conhecimento acerca da nanotoxicologia das AgNPs contribui diretamente com os

estudos e pesquisas relacionados ao combate contra o câncer, visto que é possível determinar as possíveis alterações geradas em nível celular (DURÁN et al., 2019). Como listado anteriormente, são inúmeras respostas celulares geradas que, de maneira geral, minimizam a proliferação/viabilidade celular, podendo gerar danos irreversíveis favorecendo a indução da célula cancerígena à morte. Portanto, torna-se claro que essas AgNPs possuem alto potencial antitumoral e, por isso, nos últimos anos há um aumento crescente na busca da manipulação dessas AgNPs para aplicação médica, com o intuito de gerar melhorias de tratamentos tradicionais ou no surgimento de novas terapêuticas (CARVALHO LOPES; PEREIRA TORRES, 2020).

Uma das formas de aplicação para o combate do câncer dessas AgNPs está associado a produção de NM inorgânicos, no entanto, há barreiras que dificultam essa produção e estão diretamente relacionadas as inúmeras características físico-químicas apresentadas por essas nanopartículas como, alta relação superfície/volume e de energia superficial. Essas duas propriedades favorecem a interação entre as próprias nanopartículas ocasionando o surgimento de aglomerados ou agregados em meios biológicos, dificultando dessa forma, seu uso na área biomédica (CARVALHO LOPES; PEREIRA TORRES, 2020)..

Além disso, as AgNPs são vistas como “corpos estranhos”, diminuindo dessa maneira, sua biocompatibilidade com tecidos humanos, ocasionando toxicidade tanto em células cancerígenas como em saudáveis. No entanto, uma das formas de contornar essas barreiras está relacionada ao controle que pode ser obtido sobre algumas características físico-químicas como: tamanho, forma e componentes de superfície dessas AgNPs através, por exemplo, do uso de agentes estabilizantes. Além disso, o tipo de síntese e o protocolo estipulado está diretamente relacionado as modulações que podem ser realizadas (CARVALHO LOPES; PEREIRA TORRES, 2020).

#### **1.4.1 Síntese**

Existem diferentes métodos de síntese que englobam a produção de AgNPs, e estes se correlacionam de maneira direta com as propriedades físico-químicas apresentadas. A síntese química é uma abordagem amplamente utilizada, envolvendo a redução de íons de prata por agentes redutores em meio aquoso ou orgânico (ABBASI E. et al., 2016). Observa-se que a escolha do agente redutor e as condições de reação influenciam diretamente nas características físicas, como tamanho médio, distribuição de tamanho e morfologia das AgNPs. Além disso, a utilização de diferentes agentes estabilizadores pode modular propriedades de estabilidade

coloidal, aspecto crucial para aplicações práticas (KANG H. et al., 2019). O ponto negativo está no fato de utilizar reagentes tóxicos, levando a preocupações ambientais (ABBASI E. et al., 2016).

De maneira geral, para que a síntese química possa ocorrer, há a necessidade de que aconteça a redução química do sal/nitrato de prata, para que em seguida, possa ocorrer a formação da suspensão coloidal das AgNPs. Para que todas essas etapas sejam estabelecidas, há a necessidade dos seguintes componentes: precursor (nitrato de prata), agente de redução e agente estabilizador. A formação de soluções coloidais a partir da redução de sais de prata envolve três fases que ocorrem em sequência: redução do íon prata ao estado metálico, nucleação e crescimento (MELO et al., 2012; AGNIHOTRI et al. 2014).

A síntese biológica, ou biossíntese, é uma alternativa promissora, utilizando organismos vivos, extratos de plantas ou microrganismos para reduzir os íons de prata. Esse método, não apenas reduz íons de prata, mas também desempenha um papel fundamental na estabilização das AgNPs. Essa abordagem é mais sustentável e, frequentemente, resulta em nanopartículas mais estáveis, oferecendo potencial para aplicações biomédicas, onde a estabilidade é crucial (MOUSAVI SM., 2018).

A abordagem verde, ou *eco-friendly*, busca minimizar o impacto ambiental da síntese de AgNPs. Técnicas como a síntese por laser, radiação ultrassônica ou microondas são exploradas, oferecendo métodos mais rápidos e eficientes, muitas vezes eliminando a necessidade de solventes ou agentes redutores tóxicos. Essas técnicas permitem uma distribuição de tamanho mais estreita e maior homogeneidade, atributos desejáveis em várias aplicações (ANJANA VN. et al., 2021).

A síntese por métodos físicos, como a evaporação térmica, também é investigada, permitindo uma abordagem precisa no controle do tamanho e da forma das AgNPs. No entanto, esses métodos muitas vezes requerem condições específicas de vácuo e temperatura, podendo limitar sua aplicabilidade em larga escala, destacando assim, a importância do controle preciso do ambiente de síntese para obter AgNPs com propriedades desejadas (ABBASI E. et al., 2016).

A síntese eletroquímica, por sua vez, utiliza corrente elétrica para reduzir os íons de prata, proporcionando controle sobre a cinética da reação. Este método é altamente ajustável, permitindo a produção de AgNPs com propriedades específicas. A aplicação de corrente elétrica não apenas reduz íons de prata de maneira controlada, mas também influencia propriedades como carga superficial e potencial zeta das AgNPs. Esses parâmetros são cruciais para a interação das AgNPs com sistemas biológicos (JIANG L, SANTIAGO I, FOORD J, 2020).

Ao considerar o contexto industrial, os métodos físicos são um processo de baixo rendimento, que muitas vezes requerem alta temperatura e consumo de energia, limitando sua aplicação no setor industrial. Já as sínteses químicas e biológicas permitem a produção em grandes quantidades e com custo-benefício, por isso, acabam sendo as melhores opções para a síntese dessas AgNPs (PRABHU; POULOSE, 2012).

De maneira geral, independentemente do método de síntese realizado, é comum ocorrerem alterações na coloração durante o processo de sintetização. No entanto, fatores como tamanho, forma, dispersão e estabilidade das nanopartículas podem influenciar a percepção da cor; por exemplo, a coloração amarelada/alaranjada indica boa estabilidade e morfologia esférica. Por isso, nem todos os métodos resultarão na mesma resposta visual em termos de mudança de coloração. Algumas sínteses podem levar a cores diferentes, enquanto outras podem não apresentar uma mudança visível. Dentre as cores, a mudança de cor para amarelo/alaranjado é mais comum, mas cores como vermelho, marrom ou até mesmo esverdeado podem ser observadas, dependendo das propriedades das AgNPs e das condições de síntese específicas (ALMEIDA, J. C. B. et al., 2015; PRABHU; POULOSE, 2012; SANTOS et al., 2016).

Essa mudança de cor está associada ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície, que ocorre quando as AgNPs atingem tamanhos nanométricos específicos. Essa ressonância plasmônica pode levar à absorção preferencial de luz em certas faixas do espectro visível, resultando em uma cor específica para as nanopartículas (PRABHU; POULOSE, 2012; SANTOS et al., 2016).

Portanto, pode-se observar que a síntese de AgNPs é um campo diversificado, onde a escolha do método deve considerar não apenas a eficiência como a aplicação específica. Por isso, torna-se de significativa importância estudos que visem avaliar o potencial antitumoral de AgNPs de acordo com as diferentes características físico-químicas que podem ser variadas de acordo com o tipo de síntese estipulado.

## 2 JUSTIFICATIVA

O câncer na atualidade é tido como problemática de saúde pública global, visto que apresenta elevado nível de incidência, prevalência e mortalidade com crescimentos exponenciais. De acordo com o último relatório emitido pela Agência Internacional de pesquisa em câncer (IARC), há uma estimativa para 2040 de aumento de 28,4 milhões de novos casos de câncer, um aumento de aproximadamente 47% em relação a 2020. Já em nível nacional, são esperados 704 mil casos novos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025. Vale salientar, que dentre os inúmeros tipos de câncer o de pulmão está entre os mais incidentes e prevalentes em nível nacional e global.

Por isso, torna-se impreterível a adoção de medidas que visem se preparar para esse impacto com o intuito de minimizar a longo prazo os efeitos gerados pelo câncer. Dentre as medidas estão as melhorias no desenvolvimento de diagnósticos precoces e tratamentos eficazes. Um dos setores que ganhou e vem ganhando espaço na busca por essas melhorias foi o setor da nanotecnologia que visa à manipulação de nanopartículas para construção de nanosistemas aplicáveis na área médica.

A nanotecnologia vem com o viés de solucionar dois principais problemas enfrentados pelos tratamentos tradicionais utilizados para o câncer, o primeiro está relacionado aos diversos efeitos adversos gerados e o segundo ao aumento da resistência medicamentosa desses antitumorais. Uma das formas encontradas por esse setor nos últimos anos está na manipulação de nanopartículas metálicas. Essas nanopartículas trazem benefícios pela sua fácil obtenção, flexibilidade, maleabilidade, energia superficial dentre inúmeras características físico-químicas que podem ser controladas de acordo com o objetivo da terapêutica.

As AgNPs são exemplos de nanopartículas metálicas que vêm sendo estudadas nos últimos anos para a obtenção dessas melhorias. Esse aumento crescente e contínuo está relacionado a alguns fatores que ainda precisam ser elucidados e estudados como, mecanismos de ação antitumoral e estabilidade dessas AgNPs em solventes orgânicos. Diante disso, o projeto proposto visa contribuir com a síntese e caracterização de AgNPs a partir de dois protocolos distintos (aquecimento e resfriamento) de síntese química por redução, baseados em trabalhos previamente estabelecidos por AGNIHOTRI *et al.*(2014 e MELO *et al.*(2012), visando identificar o melhor protocolo que irá contribuir para o levantamento de dados que possam somar para uma rica discussão científica acerca dos potenciais efeitos antitumorais de AgNPs em células de câncer de pulmão, buscando também estabelecer parâmetros de estabilidade e reprodutibilidade dessas NP em meios biológicos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar a síntese química por redução de AgNPs, além de caracterizá-las e avaliar o potencial antitumoral frente a linhagem celular de câncer de pulmão (A549).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- I. Estabelecer critérios de elegibilidade (exclusão e caracterização) para a síntese química de AgNPs, a partir de diferentes protocolos, visando identificar os melhores parâmetros para um síntese eficaz tendo, por consequência, NP com efetivo efeito antitumoral.
- II. Realizar a caracterização físico-química das AgNPs segundo as normas ISO 19337, ISO 22412:2017 e NIST 1200-29, utilizando técnicas de UV-Visível, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com análise EDS, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Difração de Raio X (DRX) e Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).
- III. Avaliar a estabilidade das AgNPs ao longo do tempo em relação ao tamanho e dispersão utilizando DLS.
- IV. Avaliar o potencial antitumoral a partir de análises de proliferação, viabilidade e migração celular de linhagem tumoral (A549) e não tumoral (BEAS-2) de pulmão.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

As AgNPs utilizadas nesse projeto foram sintetizadas quimicamente, utilizando os seguintes reagentes: borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), citrato trissódico (TSC), álcool polivinílico (PVA) e nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) adquiridos da Sigma-Aldrich.

### 4.2 Síntese química por redução de nanopartículas de prata

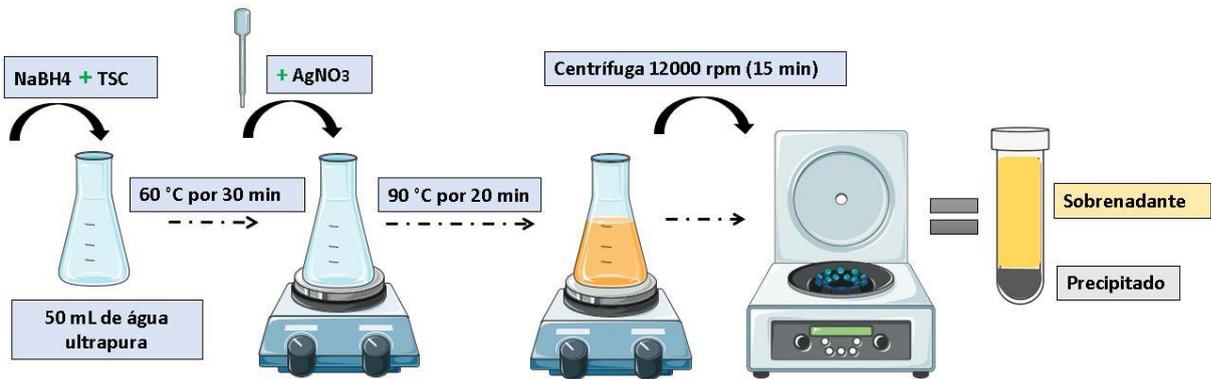
As AgNPs foram sintetizadas a partir de diferentes protocolos que se enquadram em duas classes de síntese, sendo essas, aquecimento e resfriamento. Para cada classe, há quatro subclasses de protocolos como descrito na tabela 2. O protocolo 1 (aquecimento) e o 2 (resfriamento) foram previamente estabelecidos segundo AGNIHOTRI *et al.* (2014) e MELO *et al.* (2012), respectivamente.

**Tabela 2.** Classes e subclasses da síntese de AgNPs.

|            | Classes       |               |
|------------|---------------|---------------|
|            | Aquecimento   | resfriamento  |
| Subclasses | Protocolo 1   | Protocolo 2   |
|            | Protocolo 1.1 | Protocolo 2.1 |
|            | Protocolo 1.2 | Protocolo 2.2 |
|            | Protocolo 1.3 | Protocolo 2.3 |

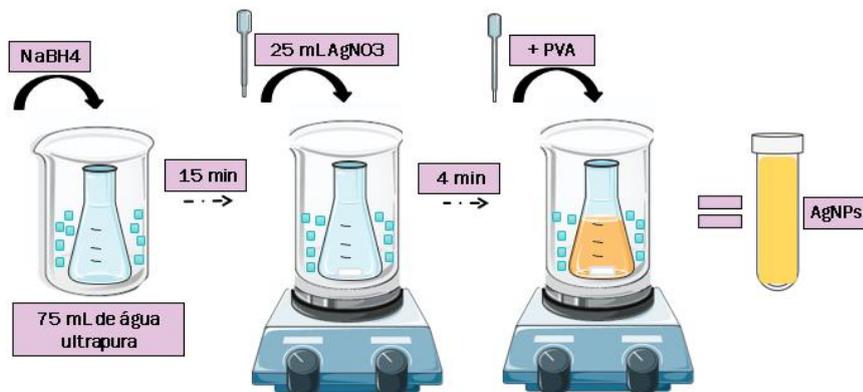
A formulação das AgNPs a partir do protocolo 1 (aquecimento) (Figura 6) se deu pela adição inicial de  $\text{NaBH}_4$  ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) e TSC ( $1,06 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) em água milli-Q (48 mL), para que em seguida, fossem aquecidos em agitação vigorosa até  $60^\circ\text{C}$ . Subsequentemente, a solução foi mantida nessas condições por 30 minutos (min), ao abrigo da luz, com agitação vigorosa para garantir uma solução homogênea. Após, 2 mL da solução de  $\text{AgNO}_3$  ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) foi adicionado gota a gota à mistura. Em seguida, a temperatura foi aumentada para  $90^\circ\text{C}$  e mantida durante 20 min até que ocorresse a mudança na coloração de transparente para amarelo, indicando a formação das AgNPs.

Por último, a suspensão de AgNPs foi centrifugada (12 000 g por 15 min) para originar o sobrenadante e precipitado da solução, que em seguida, foram resfriados e armazenados a temperatura ambiente. A centrifugação é fundamental para separar excesso de reagentes e íons  $\text{Ag}^+$  das NP. Logo, o sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspenso em água milli-Q para uso nos experimentos posteriores.



**Figura 6. Síntese de AgNPs protocolo 1:** etapas constituintes da síntese realizada pelo protocolo 1 (aquecimento).

Já para o protocolo 2 (resfriamento), foi adicionado em um Erlenmeyer de 250 mL, 75 mL de uma solução  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L de NaBH<sub>4</sub>. O frasco, foi então colocado em um banho de gelo (0°C) durante 10 a 15 min. Em seguida, colocou-se uma barra magnética no frasco e o conjunto foi levado a uma placa de agitação. Com o auxílio de uma pipeta pasteur, adicionaram-se, gota a gota, 25 mL de uma solução com  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L de AgNO<sub>3</sub>. Essa adição ocorreu em um período de aproximadamente 4 min, para que em seguida, o PVA (0,3%) fosse adicionado gota a gota. Essas etapas estão resumidas na figura 7 abaixo.



**Figura 7. Síntese de AgNPs protocolo 2:** etapas constituintes da síntese realizada pelo protocolo 2 (resfriamento).

Com o intuito de elucidar inconsistências apresentadas pelos protocolos 1 e 2 durante a síntese e encontrar os melhores parâmetros para uma síntese eficaz e que atenda aos objetivos almejados, foram realizadas modificações em parâmetros de cada protocolo (1 e 2), dando origem a mais três protocolos para cada classe de síntese sendo esses: protocolos 1.1, 1.2 e 1.3 (aquecimento) e 2.1, 2.2 e 2.3 (resfriamento). Dentre os parâmetros/modificações estão: concentração dos reagentes, lavagem das vidrarias, gotejamento, estabilizador, pH, lote dos reagentes, tempo de virada e solução intermediária como descrito na apêndice A.

Visando identificar o melhor lote de AgNPs, ou seja, aquele que apresente um efetivo potencial antitumoral, foram estabelecidos critérios de elegibilidade (exclusão e caracterização). Para os de exclusão foram determinados os seguintes critérios: coloração, turbidez e UV-visível. Já para os de caracterização foram estipulados: DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz); Potencial Zeta (PZ); DRX (Difração de Raio X); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET), como descrito na tabela 4 e 5 abaixo. Ambos os critérios foram selecionados, pois são determinantes para estudar e compreender as NP (morfologia, estabilidade, tamanho, estrutura cristalina dentre outros), como representado pelo guia do NIST 1200-29 (*Preparation, characterization, and biological activity of stability-enhanced polyethyleneimine-conjugated gold nanoparticles (Au-PEI@NIST) for biological application*) (HACKLEY et al., [s.d.]).

**Tabela 4. Critérios de exclusão da síntese de AgNPs.**

| CLASSES DE SÍNTESE | PROTOCOLOS (SUBCLASSES) | SOLUÇÕES DE AgNPs/LOTE | CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO |          |            |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------|------------|
|                    |                         |                        | Coloração             | Turbidez | UV visível |
| AQUECIMENTO        | PROTOCOLO 1             | AgNp 01                |                       |          |            |
|                    | PROTOCOLO 1.1           | AgNp 02                |                       |          |            |
|                    | PROTOCOLO 1.2           | AgNp 03                |                       |          |            |
|                    | PROTOCOLO 1.3           | AgNp 04                |                       |          |            |
| RESFRIAMENTO       | PROTOCOLO 2             | AgNp 05                |                       |          |            |
|                    | PROTOCOLO 2.1           | AgNp 06                |                       |          |            |
|                    | PROTOCOLO 2.2           | AgNp 07                |                       |          |            |
|                    | PROTOCOLO 2.3           | AgNp 08                |                       |          |            |

**Legenda:** Critérios de exclusão estabelecidos para cada lote de AgNPs sintetizados pelos diferentes protocolos. Será preenchido em vermelho (reprovado) e verde (aprovado).

**Tabela 5. Critérios de caracterização da síntese de AgNPs.**

| CLASSES DE SÍNTESE | PROTOCOLOS (SUBCLASSES) | SOLUÇÕES DE AgNPs/LOTE | CRITÉRIOS DE CARACTERIZAÇÃO |                |     |     |     |     |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|
|                    |                         |                        | DLS                         | Potencial zeta | DRX | MET | MEV | NTA |
| AQUECIMENTO        | PROTOCOLO 1             | AgNp 01                |                             |                |     |     |     |     |
|                    | PROTOCOLO 1.1           | AgNp 02                |                             |                |     |     |     |     |
|                    | PROTOCOLO 1.2           | AgNp 03                |                             |                |     |     |     |     |
|                    | PROTOCOLO 1.3           | AgNp 04                |                             |                |     |     |     |     |
| RESFRIAMENTO       | PROTOCOLO 2             | AgNp 05                |                             |                |     |     |     |     |
|                    | PROTOCOLO 2.1           | AgNp 06                |                             |                |     |     |     |     |
|                    | PROTOCOLO 2.2           | AgNp 07                |                             |                |     |     |     |     |
|                    | PROTOCOLO 2.3           | AgNp 08                |                             |                |     |     |     |     |

**Legenda:** Critérios de caracterização estabelecidos para cada lote de AgNPs sintetizados pelos diferentes protocolos. Será preenchido em vermelho (reprovado) e verde (aprovado).

Os critérios de exclusão e caracterização foram preenchidos, como aprovados e reprovados para cada lote de AgNPs baseados em objetivos previamente estabelecidos. Para os critérios de exclusão, foram: AgNPs com solução amarelo/alaranjado coloidal, sem presença de turbidez e com picos únicos de absorbância acima de 1,5 (UA) em comprimentos de onda de 400 nm. Por fim, os lotes de AgNPs que apresentaram os parâmetros preenchidos como aprovados em todas os critérios, passaram para o de caracterização.

Nos critérios de caracterização, os objetivos almeçados foram: AgNPs com tamanho médio de  $30 \pm 10$  nm, boa estabilidade em solução (carga superficial de  $\leq -30$  mV), estrutura cristalina referente às AgNPs, composição química sem contaminação e boa dispersão/homogeneidade. Ao cumprir todos os critérios de exclusão e caracterização como aprovados, os lotes de AgNPs correspondentes foram utilizados nos experimentos celulares de viabilidade e efeito antiproliferativo.

### **4.3 Caracterização das nanopartículas de prata**

#### **4.3.1 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível (UV-Visível)**

Leituras de UV-Visível foram realizadas para confirmação da produção de NP. A absorbância foi medida nos comprimentos de onda na faixa de 200-800 nm, a uma resolução de 2 nm, em placa de 96 poços (Corning®) em um espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA). Para a avaliação das mudanças do espectro de lotes de AgNPs produzidas sem presença de estabilizador foi estabelecido um período de análise total de 5 meses.

#### **4.3.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)**

O Diâmetro Hidrodinâmico médio, o Índice de Polidispersão (PDI), Potencial Zeta (PZ) e estabilidade das amostras produzidas foram medidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments GmbH). Para isso, as AgNPs foram analisadas em água ultrapura (Milli-Q) e nos meios de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *Low Glucose e High Glucose* (Sigma-Aldrich) e *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640 *GlutaMAX* Gibco™) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™), em uma cubeta de poliestireno de 10 mm com um volume total de 1mL, a 25 °C. A estabilidade das AgNPs foram avaliadas em água ultrapura (Milli-Q) nos períodos de novembro (2022), agosto

(2023), outubro (2023), dezembro (2023) e fevereiro (2024).

#### **4.3.3 Rastreamento de nanopartículas (NTA)**

A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada com a finalidade de determinar a concentração (número de partículas/mL) e a distribuição de tamanho das AgNPs. Para calibração do equipamento (ZetaView, Particle Metrix, Germany) antes da leitura das amostras foram utilizadas nanopartículas de poliestireno (Microtrac GmbH) com tamanho médio de 100 nm. Em seguida, as NP foram diluídas em 100x em água destilada e injetadas na câmara de amostra utilizando seringa estéril, até preenchimento completo do compartimento (1 mL). As medidas foram feitas dentro do intervalo de diluição ótimo ( $9 \times 10^7 - 2,9 \times 10^9$  partículas/mL) para o software (ZetaView Software, Particle Metrix GmbH) a uma temperatura de 25°C.

#### **4.3.4 Difração de Raios X (DRX)**

Uma pequena quantidade correspondente ao precipitado em pó de AgNPs foi colocado em suportes de alça de náilon de 10 mm em “loop” (Hampton Research, EUA) e submetidos à análise de difração de pó em difratômetro SuperNova (Rigaku, EUA), à temperatura ambiente, operando a 40 W (50 kV e 0,8 mA), com radiação  $\text{CuK}\alpha$  (1,5416 Å) e rotação phi- scan, com detecção na faixa de 20° a 90° (ângulos 2 $\theta$ ). As imagens de difração foram processadas com CrysAlisPro® (Agilent).

#### **4.3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para todas as análises de MET referentes ao tamanho e forma das NP, uma gota correspondente a 5 $\mu$ L da solução de NP em água ultrapura foi depositada em grade de cobre (200 mesh) revestida por Formvar e secas no dessecador a vácuo. O número de NP a serem analisadas foi de n=500 partículas. As micrografias foram obtidas após análise no MET (Tecnai Spirit G2, FEI, USA) operando a 80 kV e, o software ImageJ foi utilizado para estimar o diâmetro e o fator de forma (circularidade) das NP a partir das micrografias obtidas.

#### **4.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios X (EDS)**

Com a finalidade de obter a composição elementar das nanopartículas produzidas, foram realizadas análises utilizando a técnica de espectroscopia de raios X por dispersão em

energia (EDS) em microscópio eletrônico de varredura (MEV- Quanta FEG 450 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA), operando a 5kV e utilizando detector para emissão de raios X. As AgNPs em água foram depositadas em eppendorfs para secagem em um Speedvac Vacufuge Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany) durante a noite. Posteriormente, foi realizada a análise do precipitado em pó contendo as nanopartículas, que foram depositadas em um suporte para MEV (stub) previamente recoberto por fita dupla face de carbono.

#### **4.4 Cultivo Celular**

As células utilizadas no projeto são de linhagem humana, referentes a tecido tumoral (A549) e não tumoral (BEAS-2B) de pulmão. Todas essas linhagens celulares são epiteliais e foram adquiridas do Master Bank do Laboratório de Biologia de Células Eucariontes (LABIO) do Inmetro através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Tal linhagem foi autenticada por STR e testada para a presença de micoplasmas.

##### **4.4.1 Meio de cultivo**

Os meios de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Low Glucose e High Glucose* (Sigma-Aldrich) foram utilizados nas linhagens celulares selecionadas, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™). Especificamente, o meio DMEM *Low glucose* foi selecionado, devido a célula não tumoral BEAS-2B. Já o meio DMEM *High glucose*, para a célula tumoral A549. Todas as linhagens foram mantidas em estufa umidificada a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> para posteriores experimentos.

##### **4.4.2 Determinação das curvas de crescimento pelo ensaio colorimétrico MTT**

Com o objetivo de determinar a faixa de trabalho para a densidade celular nos períodos de 24h, 48h e 72h, foram elaboradas curvas de crescimento para cada linhagem celular. Para cada uma delas, foram utilizadas cinco concentrações (conforme apresentado na Tabela 6), definidas com base em estudos anteriores (AHMAD et al., 2022; MUHAMAD et al., 2022) que se referem, respectivamente, às linhagens celulares A549 e BEAS-2B.

O ensaio colorimétrico utilizando MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) foi conduzido para determinar a densidade celular. Desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente viáveis convertem

o sal MTT, inicialmente amarelo, em formazana, um composto de coloração roxa-azulada. As células foram cultivadas em placas de 96 poços Millicell® EZ e, após adesão durante a noite, foram tratadas com meio de cultura DMEM *low e high* suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo MTT a uma concentração de 1,0 mg/mL em cada poço.

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa úmida por três horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazana foram solubilizados com 100 µL de isopropanol. As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas multimodal Synergy™ HTX, utilizando um comprimento de onda de 570 nm.

**Tabela 6. Concentrações estipuladas para as curvas de crescimento.**

| <b>Linhagens Celulares</b> | <b>Concentrações (célula/poço)</b> |                     |                     |                     |                      |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>A549</b>                | 6 x 10 <sup>2</sup>                | 7 x 10 <sup>3</sup> | 8 x 10 <sup>3</sup> | 9 x 10 <sup>3</sup> | 10 x 10 <sup>4</sup> |
| <b>BEAS-2B</b>             | 2,5 x 10 <sup>2</sup>              | 5 x 10 <sup>3</sup> | 7 x 10 <sup>3</sup> | 1x 10 <sup>4</sup>  | 20 x 10 <sup>3</sup> |

## **4.5 Potencial antitumoral**

### **4.5.1 Ensaio de viabilidade celular por redução de MTT e determinação da concentração inibitória média IC-50**

O ensaio de MTT é uma técnica colorimétrica utilizada para avaliar a viabilidade celular. Nas condições normais de integridade celular, as desidrogenases mitocondriais reduzem o sal tetrazólio MTT, gerando um produto chamado formazana. Se a atividade mitocondrial estiver comprometida, a produção de formazana diminui, indicando uma redução na atividade celular e, portanto, uma possível diminuição na viabilidade. No caso específico da linhagem celular A549 e BEAS-2B, a viabilidade foi examinada após exposição a AgNPs. As células foram cultivadas em placas de 96 poços Millicell® EZ a uma densidade de 7 x 10<sup>6</sup> células/poço e tratadas com diferentes concentrações (10; 25; 50; 75 e 100 µg/ml) de AgNPs por 24, 48 e 72 horas. O meio de cultura utilizado foi o DMEM *Low e high*, com adição de 10% de SFB, contendo MTT a uma concentração de 1,0 mg/mL. Como controle positivo para morte celular, as células foram tratadas com Triton™ X-100 a 0,1%. Após incubação por três horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazana foram dissolvidos em 100 µL de isopropanol. As leituras de absorbância foram feitas em um leitor de microplacas

Synergy™ HTX a 570 nm.

Os dados de viabilidade obtidos pelo MTT foram utilizados para a realização do IC-50 para determinação da concentração de AgNPs que levou a redução de 50% da viabilidade celular. Para isso, os dados de absorvância foram normalizados para porcentagem e as concentrações para Log (logaritmo). A estatística e os gráficos foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 9 (San Diego, California, EUA).

#### **4.5.2 Ensaio de viabilidade celular por atividade de Lactato Desidrogenase (LDH)**

A presença de LDH no sobrenadante do cultivo celular representa perda de integridade da membrana celular. Quando as células morrem por necrose e, conseqüentemente, a membrana deixa de possuir sua integridade nativa, ocorre a liberação da enzima LDH no meio de cultura. A atividade de LDH foi analisada através de um kit comercial colorimétrico não radioativo, CyQuant LDH (Invitrogen). As células A549 e BEAS-2B foram cultivadas em placas de 96 poços Millicell® EZ (Milipore Corp., Billerica, MA, USA) a uma densidade de  $7 \times 10^3$  células/poço, onde aderiram overnight. As placas foram tratadas com AgNPs, nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , nos tempos de 24, 48 e 72h. Após o tratamento, 10  $\mu\text{L}$  do tampão de lise celular foram adicionados aos poços de liberação máxima de LDH, enquanto 10  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q foram adicionados aos poços de liberação espontânea de LDH. A placa foi armazenada a 37°C por 45 minutos em estufa 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, o controle positivo de morte celular foi adicionado em poços de nova placa de 96 poços com ausência de células e 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram coletados e incubados com 50  $\mu\text{L}$  do substrato nesta placa por 30 min na ausência de luz, em agitador de placas e temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução de parada e a placa foi mantida por 1h em agitador. Por fim, após esse período, o resultado colorimétrico foi obtido através do leitor de microplaca multimodal de absorvância Synergy™ HTX em comprimento de onda de 490 nm. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 9 (San Diego, California, EUA).

#### **4.5.3 Monitoramento da Proliferação Celular em Tempo Real por Impedância Elétrica**

As células da linhagem A549 e BEAS-2B foram semeadas em placas de 96 poços do tipo E-Plate View xCELLigence RTCA SP, com uma densidade de  $7 \times 10^3$  células por poço. Estas placas possuem microeletrodos de ouro fundidos na superfície inferior, e o sistema é

ajustado com um potencial elétrico de 22 mV. O procedimento foi conduzido conforme as instruções do fabricante, que envolvem a calibração inicial com meio de cultura e a configuração do instrumento para monitorar em tempo real as células, registrando a impedância elétrica a cada hora durante um período de 96 horas. Após a adesão das células durante a noite, elas foram expostas às AgNPs em diferentes concentrações (10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL) e o tratamento foi mantido durante as 72 horas subsequentes de monitoramento. Esse método baseia-se na medição da impedância celular para detectar pequenas variações na resposta das células a diferentes estímulos. O índice celular (IC) é calculado pelo sistema como:  $IC = (\text{Impedância em um determinado ponto de tempo} - \text{impedância na ausência de células}) / \text{valor nominal da impedância}$ . Os dados foram automaticamente registrados e analisados por um programa específico instalado em um computador conectado ao equipamento para realização da análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 9 (San Diego, Califórnia, EUA).

#### **4.5.4 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo**

A verificação de morte celular foi realizada através de citometria de fluxo, com o intuito de avaliar se houve morte celular por apoptose ou necrose. Células A549 e BEAS-2B foram cultivadas a uma densidade de  $7 \times 10^3$  células por poço em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e, após adesão *overnight*, foram tratadas sob as concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL de AgNPs durante 72h. No dia da análise, as células foram tripsinizadas (tripsina a 0,125%) e centrifugadas durante 5 min, a 1500 rpm. Em seguida, a tripsina foi inativada utilizando meio DMEM *Low e high* contendo SFB e, após a ressuspensão das células, as mesmas foram inseridas em Câmara de Neubauer para contagem. Um total de  $2 \times 10^5$  células foi separado para cada uma das condições experimentais (controles e tratamentos). As células, de cada condição, foram lavadas novamente com PBS, centrifugadas durante 5 min, a 1500 rpm e, finalmente, ressuspensas em 100 µL de tampão Anexina V 1x. Adicionou-se 5 µL de Alexa Fluor™ 488 Anexina V e 1 µL de Iodeto de Propídeo (PI) nas condições de tratamento e controles (levando em consideração a presença de apenas Anexina V no controle de apoptose, PI no controle de necrose, a presença de ambos no controle de viabilidade sem NP e a ausência de ambos na condição Branco), de acordo com as instruções do fabricante do kit. Após 15 min de incubação no gelo, adicionou-se 400 µL de tampão de ligação à Anexina 1x. A leitura de 20.000 eventos foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACSAria™ III) e a posterior análise efetivada através do software BD FACSDiva™ 8.0 (BD Biosciences). Durante a análise dos dados, as células negativas tanto para Anexina V quanto para PI foram consideradas viáveis. Por fim, os valores

de células viáveis, apoptóticas ou necróticas foram plotados em um gráfico sob a forma de porcentagem, utilizando o software GraphPad Prism 9 (San Diego, California, EUA).

#### **4.5.5 Ensaio de migração celular**

Alterações no potencial migratório foram analisadas por meio da técnica de wound healing. As células A549 E BEAS-2B foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço e, quando atingiram a confluência, um risco foi feito manualmente sobre a monocamada utilizando uma ponteira de micropipeta estéril. Imagens por microscopia óptica foram obtidas em microscópio invertido Zeiss imediatamente (0 h) e após 48h e 72h nas concentrações de 10; 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs. A área entre as duas margens da monocamada celular foi riscada e quantificada utilizando o programa ImageJ 1.48v (MRI Wound Healing Tool). Os valores obtidos em triplicata no tempo 0 h foram normalizados para 1, e os demais valores representados em porcentagem de migração e plotados em um gráfico utilizando o programa GraphPad Prism 9 (San Diego, CA, EUA).

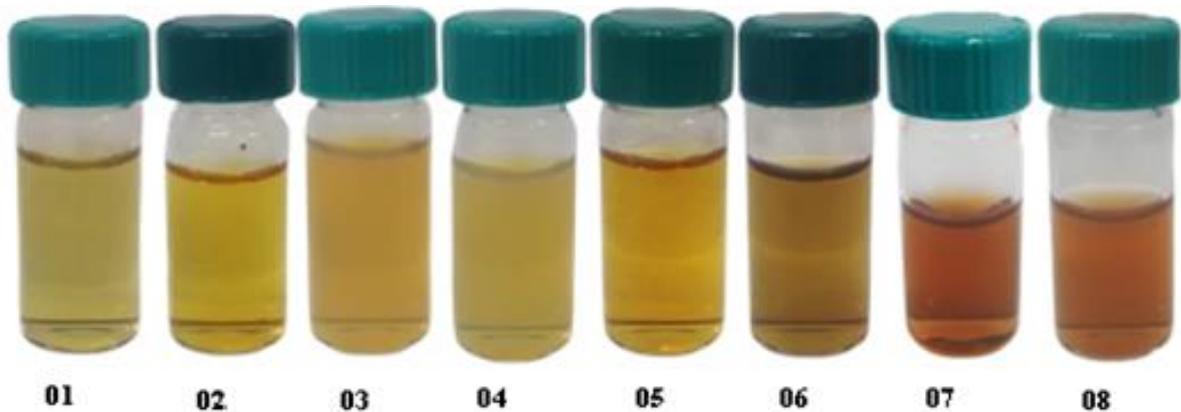
#### **4.6 Análise estatística**

Os dados referentes à caracterização de AgNPs foram representadas por média dos dados brutos na escala de  $\text{nm} \pm$  desvio padrão, enquanto os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média dos dados brutos da D.O. (densidade óptica). Sendo 570 nm para o MTT ( $\text{média} \pm$  desvio padrão) e 490 para o LDH em porcentagem  $\pm$  desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste t não pareado e teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey ou Dunnett, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese química de AgNPs

A síntese de AgNPs utilizando diferentes protocolos resultaram na síntese de 8 lotes/soluções de AgNPs, sendo 4 correspondentes a classe de aquecimento e 4 ao resfriamento, como observado na Figura 8 abaixo. Vale ressaltar, que para cada lote, a foto foi tirada logo após a síntese.



**Figura 8. Lotes de AgNPs sintetizadas.** Síntese de AgNPs a partir de diferentes protocolos, originando 8 lotes de AgNPs, sendo 4 correspondentes a classe de aquecimento e 4 a de resfriamento. Foram realizados três experimentos independentes.

Pretendendo atender aos objetivos almeçados pelos critérios de exclusão e caracterização (conforme descrito na metodologia), cada lote foi avaliado individualmente, iniciando pelos parâmetros de exclusão, sendo esses, coloração, turbidez e UV-Visível. Começando pela coloração, é sabido, que a indicação inicial de uma síntese de solução coloidal de AgNPs é a mudança de coloração para um tom amarelado/alaranjado. Isso tende a ocorrer independente da rota de síntese selecionada (química, física ou biológica), fenômeno esse, que pode ser explicado pelo efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (RPSL) que ocorre em metais nobres em forma coloidal, como a prata (PRABHU; POULOSE, 2012). Esse fenômeno consiste na interação da luz (onda eletromagnética) com os elétrons da superfície da nanopartícula, originando dessa forma, uma oscilação dos elétrons acompanhada da absorção de luz, que irá resultar na modificação da coloração (SANTOS et al., 2016).

Sendo assim, é possível observar que dentre os lotes, todos apresentaram o fenômeno de RPSL. No entanto, as colorações obtidas foram variadas, podendo encontrar diferentes tons de amarelo/alaranjado (01,02,03 e 04) marrom (06) e cobreado (07 e 08). Essas colorações

podem trazer indicativos em relação a homogeneidade da solução, visto que, quanto mais escura for, maior a tendência da solução ser heterogênea em relação a forma e tamanho (ALMEIDA et al., 2015). Dessa forma, sintetizar um lote de AgNPs que apresente uma coloração amarelada/alaranjada é um indicativo de maior homogeneidade.

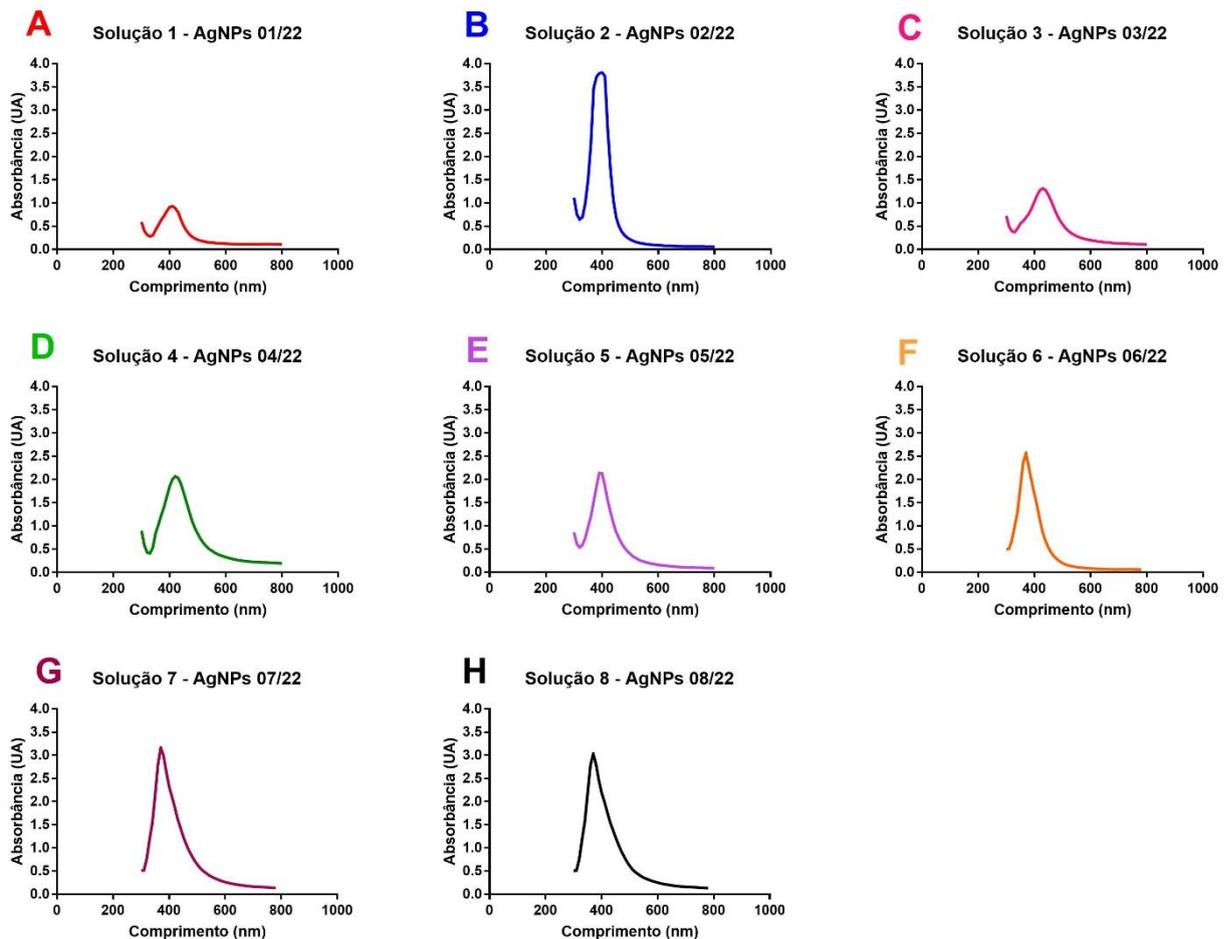
Um dos fatores determinantes para que a solução continue com a coloração amarelada e estável por um período de tempo mais prolongado, é a associação de estabilizadores (PVA ou TSC) que permitem que as nanopartículas continuem em suspensão, não precipitando ou aglomerando. Esses estabilizadores adsorvem na superfície das AgNPs, formando uma camada auto-organizada, dificultando dessa maneira, a coalescência entre as NP (MELO,2012).

Ademais, a solução amarelada precisa também ser translúcida, por isso, outro critério avaliado, é a turbidez, uma vez que, a solução de AgNPs com aspecto turvo/leitoso pode ser um indício de impurezas, lavagem de vidraria realizada da maneira errada ou excesso de reagentes utilizados durante a síntese (MELO, 2012). Partindo desse princípio, as soluções que foram reprovadas em relação a coloração e turbidez foram: 03, 04,07 e 08.

Adicionalmente, o último critério de exclusão selecionado, foi a análise dos lotes de AgNPs por UV-Visível, visto que, a partir dessa análise, é possível determinar a formação de NP. Isso também é decorrente do fenômeno de RPSL citado anteriormente, que no caso das AgNPs, ocasiona uma absorção da luz na região do visível do espectro, entre 350-450 nm. Logo, picos determinantes entre esse intervalo de espectro, são característicos de síntese de AgNPs (ALMEIDA et al., 2015).

Sabe-se que, a largura da banda plasmônica e o pico possuem relação direta com tamanho e forma das NP. Especificamente para as AgNPs, picos únicos no comprimento de onda de 400 nm são indicativos de NP com formato esférico e tamanho reduzido (10 a 30 nm) (PINHEIRO; PANDOLI, 2015). É sabido também, que nanopartículas com tamanhos reduzidos possuem maior potencial antitumoral (DURÁN et al., 2019). Além disso, de acordo com a Lei de Beer, quanto maior a absorbância do pico, maior tende a ser a concentração de NP em solução.

Portanto, ao analisar os lotes de AgNPs (figura 9) foi possível determinar quais são as AgNPs que atendem aos objetivos citados anteriormente. De maneira geral, a grande maioria dos lotes apresentaram picos altos (acima de 1,5 AU) no comprimento de onda de 400 nm ou próximo, com pequena largura de banda plasmônica, sendo um indicativo de morfologia esférica, tamanho reduzido e boa concentração de NP. No entanto, os lotes 01 e 03 apresentaram picos de absorbância abaixo de 1,5 (UA) e mais alargados, sendo então reprovados na análise de UV-Visível.



**Figura 9.** UV-Visível de todos os 8 lotes de AgNPs. Bandas plasmônicas de cada lote de AgNPs, sendo: (A) 01; (B) 02; (C) 03, (D) 04, (E) 05, (F) 06, (G) 07, (H) 08.

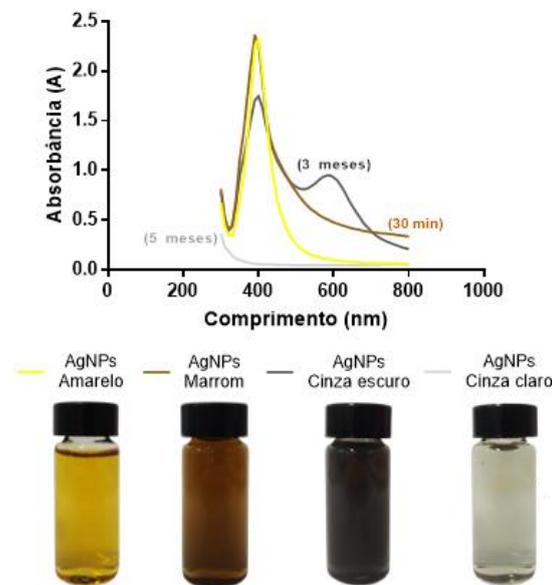
Ao compilar os resultados provenientes da coloração, turbidez e UV- Visível, as soluções tiveram os critérios preenchidos como aprovados e reprovados como demonstrado na tabela 7. Como pode ser observado, os lotes 02 e 05 foram preenchidos como aprovados em todos os critérios de exclusão, sendo, respectivamente, sintetizados pelo protocolo 1 e 2.

**Tabela 7.** Critérios de exclusão preenchidos.

| CLASSES DE SÍNTESE | PROTOCOLOS (SUBCLASSES) | SOLUÇÕES DE AgNPs/LOTE | CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO |          |            |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------|------------|
|                    |                         |                        | Coloração             | Turbidez | UV visível |
| AQUECIMENTO        | PROTOCOLO 1             | AgNp 01                | Red                   | Green    | Red        |
|                    | PROTOCOLO 1.1           | AgNp 02                | Green                 | Green    | Green      |
|                    | PROTOCOLO 1.2           | AgNp 03                | Red                   | Red      | Red        |
|                    | PROTOCOLO 1.3           | AgNp 04                | Red                   | Red      | Green      |
| RESFRIAMENTO       | PROTOCOLO 2             | AgNp 05                | Green                 | Green    | Green      |
|                    | PROTOCOLO 2.1           | AgNp 06                | Red                   | Red      | Green      |
|                    | PROTOCOLO 2.2           | AgNp 07                | Red                   | Red      | Green      |
|                    | PROTOCOLO 2.3           | AgNp 08                | Red                   | Red      | Green      |

**Legenda:** Critérios de exclusão preenchidos como aprovados e reprovados. Foram preenchidos de acordo com os objetivos almejados: solução coloidal amarelada, picos de absorbância maiores que 1,5 UA e sem presença de turbidez. Os lotes 02 e 05 foram aprovados em todos os critérios e seguiram para a caracterização.

No entanto, é possível observar que a solução correspondente ao lote 06 somente foi preenchida como reprovada no critério de coloração. Isso se deve ao fato, de que a coloração almejada pelo projeto é a amarelada/alaranjada, visto que, é uma característica de boa homogeneidade. Porém, a coloração marrom claro sem turbidez demonstrada pelo lote 06 também é tida e usada como uma boa solução de AgNPs (ALMEIDA et al., 2015). Mas, por se tratar de um lote sintetizado sem a presença do estabilizador (PVA), esse irá apresentar alta instabilidade no sistema em um curto período. Essa instabilidade gera alterações na coloração (marrom, cinza escuro e cinza claro) e modificações nas bandas plasmônicas da UV-Visível, como demonstrado na figura 10.



**Figura 10. Modificações no espectro sem o uso de estabilizador (PVA) solução 06.** Modificações na síntese de AgNPs sem uso de estabilizador, resultando em alterações na coloração, pico, largura da banda plasmônica e precipitação do sistema.

Ao analisar a figura 10, é possível observar que a mudança de coloração ocorre no decorrer do tempo, nesse caso, podendo variar de 30 min a 5 meses. De maneira geral, ao realizar a síntese referente ao protocolo 2.2 sem o uso do estabilizador, esse resultou em uma solução amarelada logo após a síntese, com pico de absorbância na UV visível determinante em 400 nm. Mas, após 30 min, há modificação para a coloração amarronzada e com largura da curva plasmônica aumentada. Após 3 meses a solução passa para um tom acinzentado escuro com bandas bimodais e início de precipitação do sistema. Já após 5 meses não há a presença de prata nanométrica, e sim, macrométrica, resultando em nenhuma banda plasmônica na UV-Visível e precipitados observados a olho nu ou no microscópio óptico. Logo, há grande instabilidade do sistema em relação ao tempo sem o uso do estabilizador.

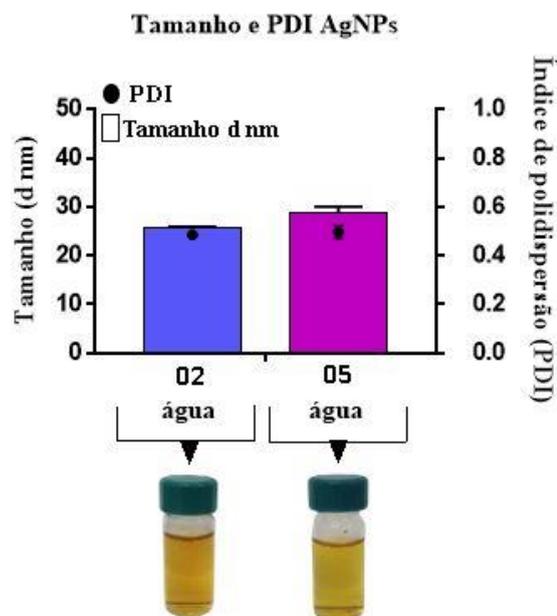
## 5.2 Caracterização das AgNPs

Os lotes que foram preenchidos como aprovados nos critérios de exclusão, seguiram para os de caracterização, sendo esses: 02 e 05. As análises referentes ao lote 02 foram feitas utilizando o precipitado da solução ressuspendida, já o lote 05 foi utilizado a solução como um todo, visto que não houve subdivisão entre sobrenadante e precipitado. Outra ressalva, é que os critérios de caracterização serão avaliados como aprovados ou reprovados no decorrer de cada análise realizada.

### 5.2.1 Espalhamento dinâmico da luz (DLS)

A análise do diâmetro médio das NP foi realizada tanto em água ultrapura como em meio de cultivo (DMEM *low*, *high* e RPMI). A solução 02 apresentou um diâmetro médio em água de  $25,77 \pm 0,08$  d nm, já a solução 05 de  $28,7 \pm 0,026$  d nm (Figura 11) corroborando, respectivamente, com AGNIHOTRI et al. (2014) e MELO et al. (2012). Pode-se observar, que os tamanhos apresentados para os distintos lotes foram semelhantes entre si, apresentando baixa diferença significativa (\* $p < 0.05$ ).

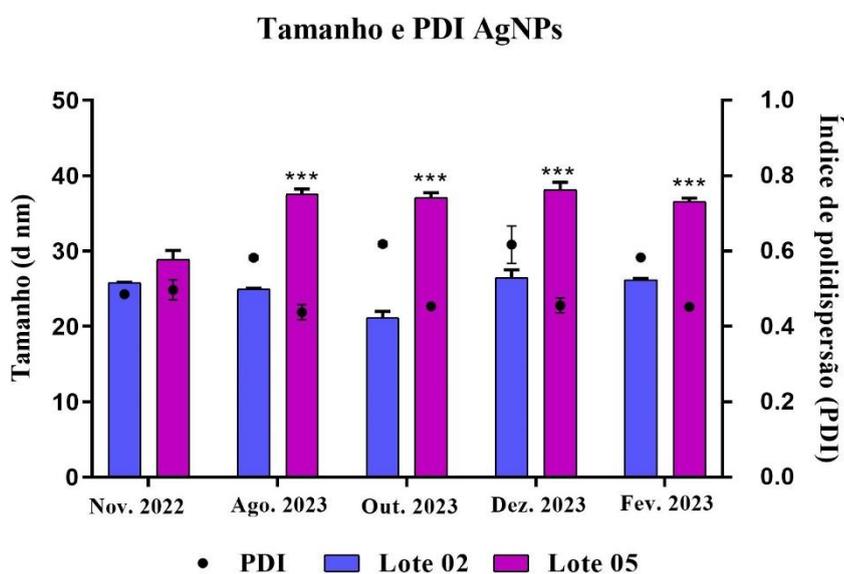
Ademais, os tamanhos obtidos em água condizem com o objetivo esperado ( $30 \pm 10$  nm), visto que, é sabido que NP de tamanho reduzido tendem a apresentar maior atividade citotóxica (DURÁN et al., 2019).



**Figura 11. Tamanho e PDI de AgNPs em água (ultrapura, Milli-Q).** Tamanho médio das NP (02) em água de  $25,77 \pm 0,08$  d nm, com PDI de  $0,485 \pm 0,001$  d nm. NP 05 em água de  $28,7 \pm 1,18$  d nm, com PDI de  $0,497 \pm 0,026$  d nm. Os dados foram expressos em média  $\pm$  DP, correspondente a um experimento com três repetições ( $n=3$ ) e valor de  $*p < 0.05$ .

A estabilidade dos distintos lotes também foi avaliada, visando analisar o comportamento das NPs em água ultrapura Milli-Q no decorrer do tempo (novembro de 2022; agosto 2023; outubro 2023; dezembro 2023 e fevereiro 2024) como representado na figura 12. É possível observar que o lote 02 continuou com o diâmetro médio no decorrer do tempo e com PDI ligeiramente aumentado, sendo  $25,77 \pm 0,08$  d nm com PDI de  $0,48 \pm 0,001$  (novembro),  $24,94 \pm 0,12$  d nm com PDI de  $0,58 \pm 0,004$  (agosto),  $21,17 \pm 0,82$  d nm com PDI de  $0,61 \pm 0,005$  (outubro),  $26,43 \pm 1,091$  d nm com PDI de  $0,61 \pm 0,04$  (dezembro) e  $26,18 \pm 0,18$  d nm com PDI de  $0,58 \pm 0,002$  (fevereiro). Portanto, o tamanho continuou estável no decorrer do tempo e condizente com o objetivo esperado ( $30 \pm 10$  nm) e o PDI, mesmo com o pequeno aumento, não é significativo.

Para o lote 05, houve o aumento do diâmetro médio após novembro de 2022 e, esse se manteve constante nos próximos meses e com PDI ligeiramente reduzido, sendo  $28,88 \pm 1,18$  d nm com PDI de  $0,49 \pm 0,021$  (novembro),  $37,57 \pm 0,64$  d nm com PDI de  $0,43 \pm 0,01$  (agosto),  $37,08 \pm 0,64$  d nm com PDI de  $0,45 \pm 0,002$  (outubro),  $38,12 \pm 0,99$  d nm com PDI de  $0,45 \pm 0,01$  (dezembro) e  $36,54 \pm 0,47$  d nm com PDI de  $0,45 \pm 0,003$  (fevereiro). Logo, mesmo com o aumento do diâmetro hidrodinâmico, esse se mantém dentro do objetivo esperado ( $30 \pm 10$  nm). Por isso, de maneira geral, ambos os lotes permaneceram estáveis no decorrer do tempo.



**Figura 12. Tamanho e PDI de AgNPs em água (ultrapura, Milli-Q).** Tamanho médio das NPs (02) em água de  $25,77 \pm 0,08$  d nm com PDI de  $0,48 \pm 0,001$  (novembro),  $24,94 \pm 0,12$  d nm com PDI de  $0,58 \pm 0,004$  (agosto),  $21,17 \pm 0,82$  d nm com PDI de  $0,61 \pm 0,005$  (outubro),  $26,43 \pm 1,091$  d nm com PDI de  $0,61 \pm 0,04$  (dezembro) e  $26,18 \pm 0,18$  d nm com PDI de  $0,58 \pm 0,002$  (fevereiro). Tamanho médio das NPs (05) em água de  $28,88 \pm 1,18$  d nm com PDI de  $0,49 \pm 0,021$  (novembro),  $37,57 \pm 0,64$  d nm com PDI de  $0,43 \pm 0,01$  (agosto),  $37,08 \pm 0,64$  d nm com PDI de  $0,45 \pm 0,002$  (outubro),  $38,12 \pm 0,99$  d nm com PDI de  $0,45 \pm 0,01$  (dezembro) e  $36,54 \pm 0,47$  d nm com PDI de  $0,45 \pm 0,003$  (fevereiro). Os dados foram expressos em média  $\pm$  DP, correspondente a um experimento com três repetições ( $n=3$ ) e valor de \*\*\*  $p < 0,001$ .

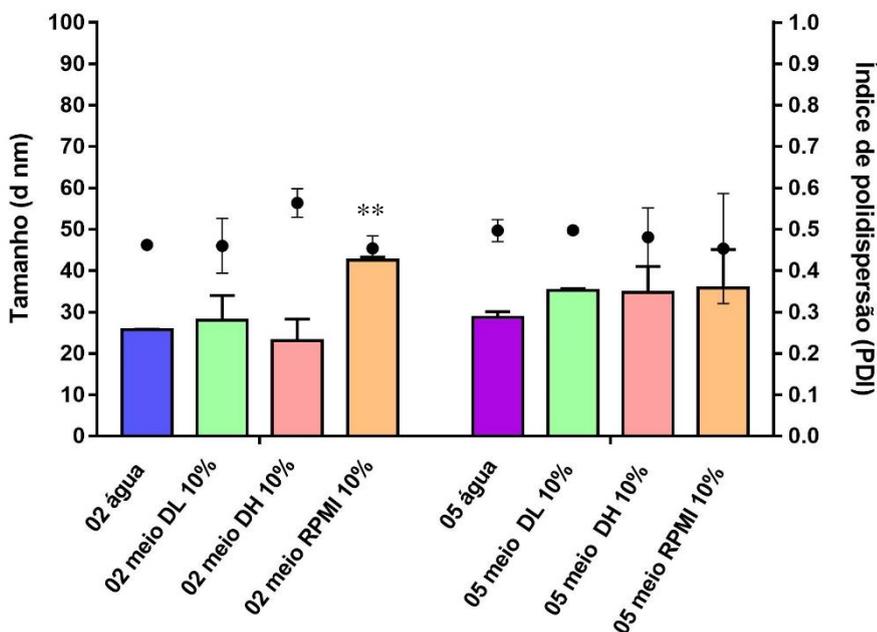
Foi também analisado o tamanho hidrodinâmico das NPs diluídas em três meios distintos (DMEM *low*, *high* e RPMI) suplementados com SFB 10%. Essa análise foi realizada, com o intuito de verificar o estado das NP sob as condições experimentais de tratamento, uma vez que, quando entram em contato com fluidos biológicos, as NP, em geral, podem tornar-se revestidas por uma camada de proteínas, formando a denominada corona proteica, que apesar de ser um fenômeno universal é distinto para cada tipo de NP (AVVAKUMOVA et al., 2018).

Sendo assim, a intensa adsorção de proteínas à superfície das NP afeta o seu comportamento biológico, ocasionalmente resultando em perda ou ganho de função (AHSAN; RAO; AHMAD, 2018).

O lote 02 em meios de cultivo (Figura 13) apresentou os seguintes diâmetros médios, sendo em DMEM *low* de  $28,08 \pm 0,44$  d nm, DMEM *high* de  $28,69 \pm 0,60$  d nm e, em RPMI de  $42,53 \pm 9,34$  d nm. Já para o lote 05 em DMEM *low* de  $35,22 \pm 0,06$ , DMEM *high* de  $34,74 \pm 0,03$  e, em RPMI de  $36,78 \pm 0,03$ . É possível notar, que para o lote 02 há aumento do diâmetro hidrodinâmico em todos os distintos meios de cultivo, no entanto, o único em que apresentou diferença significativa quando comparado em água, foi em meio RPMI (\*\* $p < 0.01$ ) e os demais meios de cultivo (DMEM *low e high*) também apresentaram diferença significativa quando comparado ao meio RPMI (\* $p < 0.05$ ). Para o lote 05 também foi possível observar aumento do diâmetro médio das NP, porém ao comparar em água e entre os meios de cultivo, não houve diferença significativa.

A partir dos dados anteriores, torna-se possível supor, que provavelmente, haja um associação maior de proteínas a superfície das NP do lote 02, indicando possível formação de corona proteica quando exposta ao meio RPMI. Além disso, mesmo com o aumento do diâmetro nos lotes de AgNPs em meio de cultivo, esses continuaram sendo satisfatórios, visto que, estão dentro do objetivo almejado ( $30 \pm 10$  nm) e dentro da escala nanométrica

### Tamanho e PDI de AgNPs 02 e 05 em água e meio de cultivo



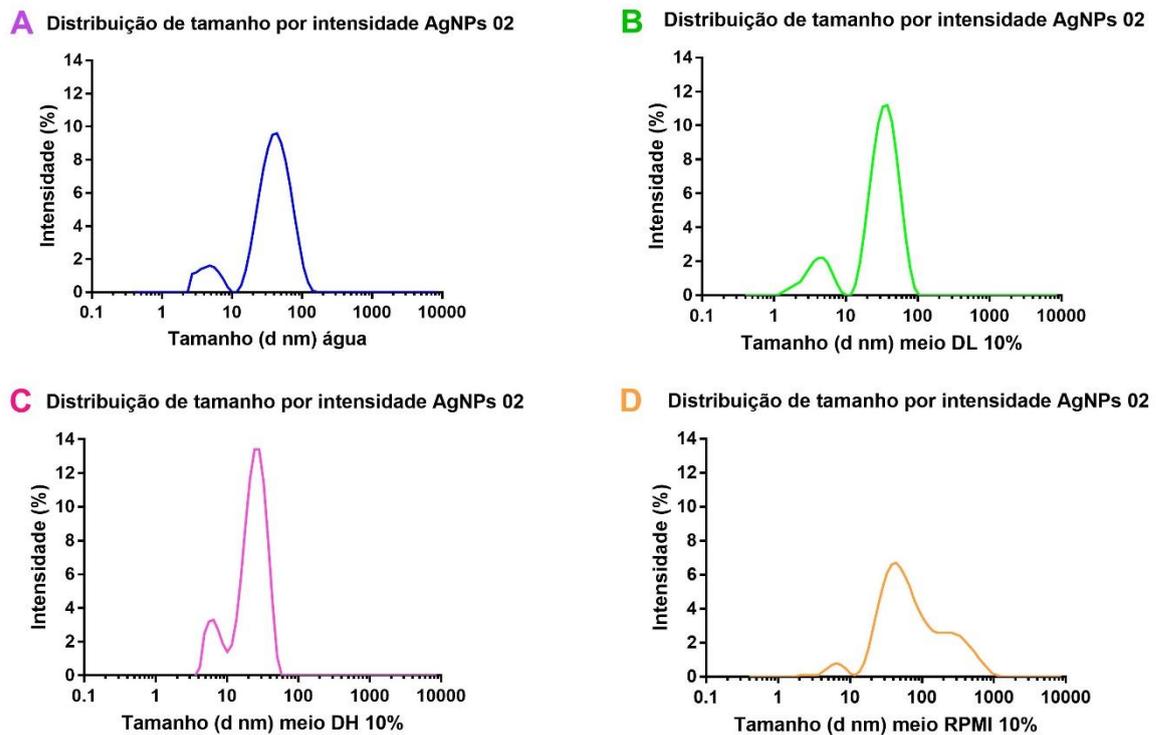
**Figura 13. Tamanho e PDI de AgNPs em meios de cultivo DMEM *low*, *high* e RPMI.** Lote 02 em DMEM low de  $28,08 \pm 0,44$  d nm com PDI de  $0,460 \pm 0,006$ , DMEM high de  $28,69 \pm 0,60$  d nm com PDI de  $0,564 \pm 0,07$  e, em RPMI de  $42,53 \pm 9,34$  d nm com PDI de  $0,454 \pm 0,13$ . Já para o lote 05 em DMEM low foi de  $35,22 \pm 0,06$  com PDI de  $0,497 \pm 0,026$  d nm, DMEM high de  $34,74 \pm 0,03$  com PDI de  $0,481 \pm 0,03$  d nm e, em RPMI de  $36,78 \pm 0,03$  com PDI de  $0,453 \pm 0,03$  d nm. Os dados foram expressos em média  $\pm$  DP, correspondente a um experimento com três repetições ( $n=3$ ) e valor de \* $p<0.05$  e \*\*  $p<0.01$ .

Além dos parâmetros de tamanho, o DLS também fornece o índice de polidispersão (PDI) que varia de 0 a 1 d nm. Esse índice avalia, o quanto determinada população de nanopartículas está homogênea ou heterogênea em relação ao seu tamanho e forma, podendo também ser indicativo de agregação/aglomeração de NP (DANAIEI et al., 2018).

O lote 02 em água apresentou um PDI de  $0,485 \pm 0,001$  d nm, já nos meios de cultivo (suplementados com 10% de SFB) foram:  $0,460 \pm 0,006$  d nm (DMEM low),  $0,564 \pm 0,07$  d nm (DMEM high) e  $0,454 \pm 0,13$  d nm (RPMI). O lote 05 em água resultou em um PDI de  $0,497 \pm 0,026$  d nm e nos meios de cultivo de  $0,497 \pm 0,06$  d nm (DMEM low)  $0,481 \pm 0,03$  d nm (DMEM high) e  $0,453 \pm 0,03$  d nm (DMEM high). De maneira geral, os dois lotes tanto em água quanto em meio de cultivo estão com os parâmetros de PDI abaixo de 0.6, indicando que as soluções apresentam boa dispersão/homogeneidade, corroborando com nanopartículas de prata padrão ouro (NM-300) oriundas da União Europeia do projeto NANOREG (KLEIN et al., 2011).

No entanto, visando compreender de maneira mais abrangente o diâmetro médio das AgNPs e a dispersão das NP em solução (PDI), os dados correspondentes a distribuição de

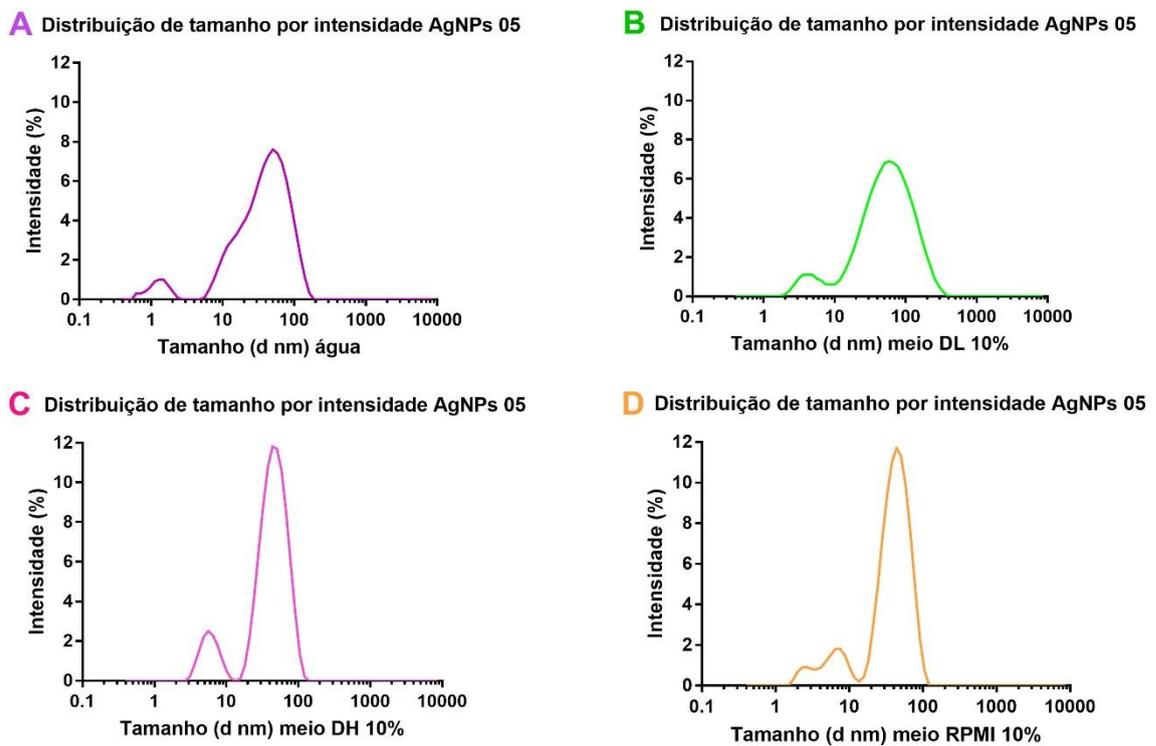
tamanho das NP, ou seja, as populações presentes dentro dos lotes 02 e 05 foram analisados. O lote 02 apresentou picos bimodais em água, meio DMEM *low e high*, mas em RPMI apresentou um terceiro pico com alargamento da curva, indicando possivelmente, um aumento de diâmetro proveniente da adsorção de proteínas (figura 14).



**Figura 14. Distribuição populacional de tamanho do lote 02 em água e meios de cultivo:** em água apresentou diâmetro de 28,57 d nm, 81,8% das NP em DL de 38,34 d nm, em meio DH 82,4% de 37,69 d nm e em meio RPMI 72,8 % de 56,33 d nm. Escala eixo X: log na base 10.

No entanto, mesmo apresentando mais de um pico, cerca de 79,6,2 % das NP em água possuem diâmetro de 37,54 d nm, 81,8% das NP em DL de 38,34 d nm, em meio DH 82,4% de 37,63 d nm e em meio RPMI 72,8 % de 56,33 d nm. O lote 05 também apresentou picos bimodais em água, meio DMEM *low e high*, mas em RPMI apresentou um terceiro pico pouco proeminente apontando diâmetros menores (figura 15). Cerca de 65,6 % das NP em água possuem diâmetro de 35,62 d nm, 57,4% das NP em DL de 38,84 d nm, em meio DH 70,1% de 37,84 d nm e em meio RPMI 63,4% de 38,73 d nm. Portanto, mesmo apresentando mais de um pico de distribuição de tamanho para ambos os lotes, a maior porcentagem das populações equivale a um determinado diâmetro. Logo, pode-se considerar um sistema de distribuição/dispersão mais homogêneo do que heterogêneo, tanto em água, quanto em meios de cultivo.

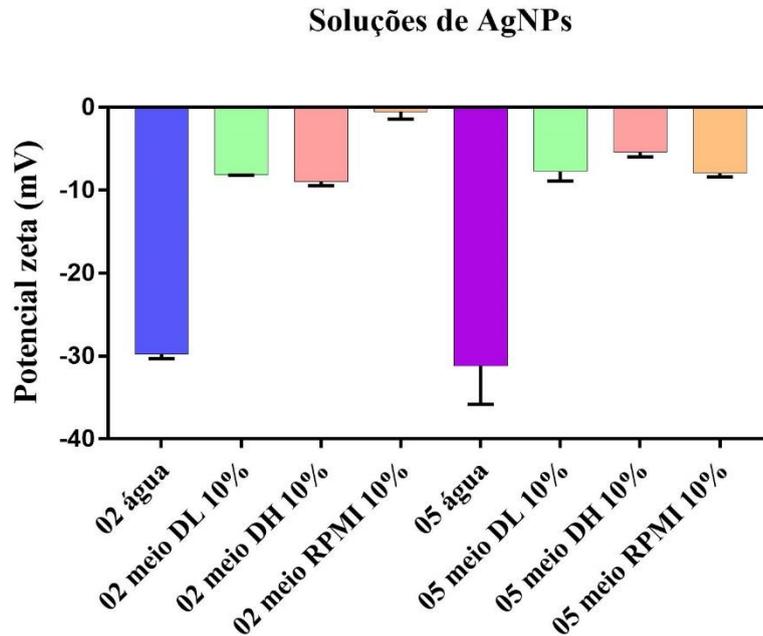
Outro parâmetro analisado no DLS foi o Potencial Zeta (PZ) que visa analisar a estabilidade das soluções de NP em suspensão. Essa estabilidade é regida por interações atrativas (principalmente van der Waals) e interações repulsivas (eletrostáticas), sendo assim, uma suspensão pode ser considerada estável quando as interações repulsivas superam as atrativas, as quais são responsáveis pela agregação e subsequente sedimentação. De maneira geral, para que uma suspensão de NP seja considerada estável, os valores de PZ precisam ser inferiores à -30 mV ou superior à +30 mV, enquanto as regiões intermediárias a esses valores indicam condições instáveis (CÂMARA; VIANA; VIANA, 2021).



**Figura 15.** Distribuição populacional de tamanho do lote 05 em água e meios de cultivo: 65,6 % das NP em água possuem diâmetro de 39,82 d nm, 57,4% das NP em DL de 38,84 d nm, em meio DH 70,1% de 37,84 d nm e em meio RPMI 63,4% de 38,73 d nm. Escala eixo X: log na base 10.

Para o lote 02 o valor do potencial zeta em água foi de  $-29,76 \text{ mV} \pm 0,55$  e em meios de cultivo:  $-8,13 \text{ mV} \pm 0,06$  (DMEM *low*),  $-8,94 \pm 0,5$  (DMEM *high*) e  $-0,55 \text{ mV} \pm 0,84$  (RPMI). O valor encontrado para o lote 05 em água foi de  $-31,16 \text{ mV} \pm 4,6$  e em meios de cultivo:  $-7,72 \text{ mV} \pm 1,14$  (DMEM *low*),  $-5,39 \text{ mV} \pm 0,59$  (DMEM *high*) e  $-7,96 \text{ mV} \pm 0,42$  (RPMI) como representado na figura 16. Em suma, o resultado em água do lote 05 é um indicativo de estabilidade e do lote 02 por mais que tenha ficado acima do valor de estabilidade, está muito próximo do mesmo, mas pode ocorrer maior presença de agregados/aglomerados. Já os de meio de cultivo, indicam uma maior instabilidade, sendo possivelmente causada pela

interação com as proteínas do meio na superfície das NP.

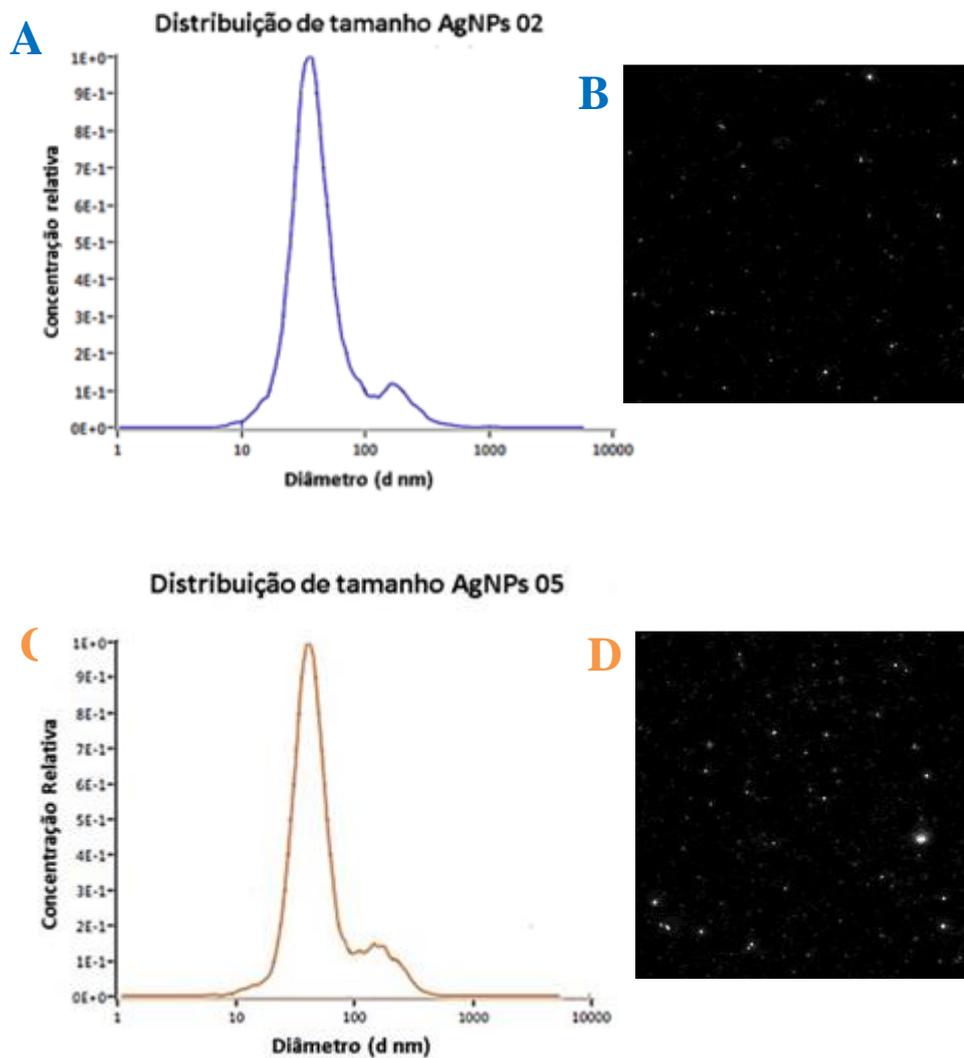


**Figura 16. Potencial Zeta (PZ) dos lotes 02 e 05.** Ambos os lotes apresentam estabilidade em água ou próximo, porém em meios de cultivo (DMEM low, high e RPMI) indicam maior instabilidade. Os dados foram expressos em média  $\pm$  DP, correspondente a um experimento com três repetições (n=3).

### 5.2.2 Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A concentração em número por mL dos lotes de AgNPs 02 e 05 e a distribuição populacional foram analisadas por NTA em água. O lote 02 apresentou um concentração total de partículas de  $2,6^9$  partículas/mL e o lote 05 de  $2,1^9$  partículas/mL. Em relação a distribuição da população, foi possível identificar, para ambos os lotes, uma distribuição em água de picos bimodais de tamanho (Figura 17 A e C) de AgNPs, corroborando com os dados de distribuição do DLS.

Para o lote 02 cerca de 90,7% da população de NP possui o diâmetro médio de 35,8 d nm (Figura 16 - A) e o lote 05 apresentou cerca de 85,6% da população com diâmetro médio de 45,1 d nm (figura 16 - C). Logo, mesmo apresentando curvas bimodais de distribuição de tamanho, a maior parte da população continua próxima ao tamanho esperado ( $30 \pm 10$  nm).



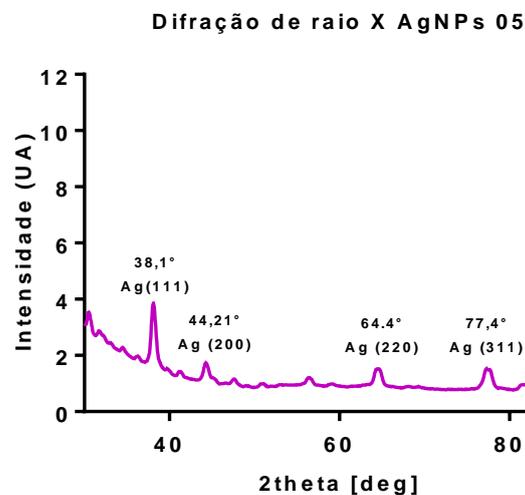
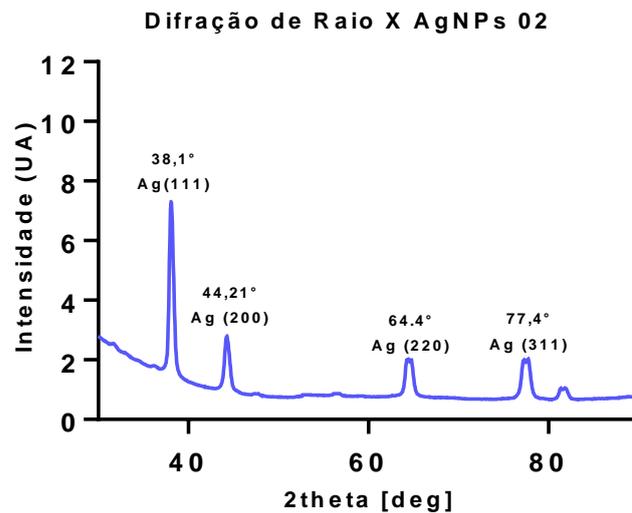
**Figura 17. Distribuição populacional e concentração das AgNPs (02 e 05).** (A) Lote 02: 90,7% da população de NP possui o diâmetro médio de 35,8 d nm e concentração total de  $2,6^9$  partículas/mL (B) Imagem das NP (C) Lote 05: 85,6% da população com diâmetro médio de 45,1 d nm e concentração total de  $2,1^9$  e (D) Imagem das NP.

Ademais, o Zeta View permite a visualização do material analisado, visto que, ao receber a incidência do laser irá refratar e, essa refração gera uma luz branca (que, nesse caso estudado, são referentes às AgNPs (Figura 17 B e D). Além disso, o Zeta View permite a análise de tamanho a partir de 10 nm, logo a população correspondente a diâmetros menores não é analisada, modificando dessa maneira, a porcentagem da população de AgNPs e a localização das curvas bimodais, podendo assim, ser uma justificativa para a diferença, mesmo que pequena, entre as porcentagens populacionais do DLS (BAREETO G., KAJIYAMA H, 2016).

### 5.2.3 Difração de Raios X (DRX)

A técnica de DRX foi empregada com o intuito de analisar e confirmar a natureza cristalina das NP. Essa análise se baseia no fato, de que os materiais cristalinos ao serem incididos por raios-X irão difratar os mesmos em um padrão único para cada tipo de material, originando picos definidos, devido à organização da estrutura cristalina (TEIXEIRA, 2014).

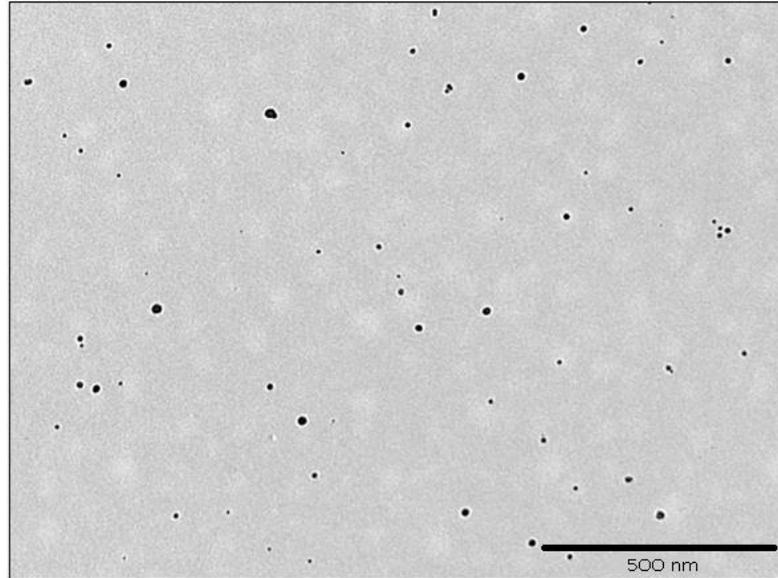
O padrão de difração é dado, a partir da intensidade relacionada com o ângulo originado pelas reflexões de Bragg ( $2\theta$ ). Para as AgNPs, pode-se estipular os valores de  $2\theta$  em  $38^\circ$ ,  $44^\circ$ ,  $64^\circ$  e  $77^\circ$  que equivalem, respectivamente, aos planos de reflexão (111), (200), (220) e (311) como relatado em JCPDS N° 89-3722. Esse padrão foi encontrado para ambos os lotes de AgNPs (02 e 05) representados nos difratogramas abaixo (figura 18), confirmando a identidade de AgNPs.



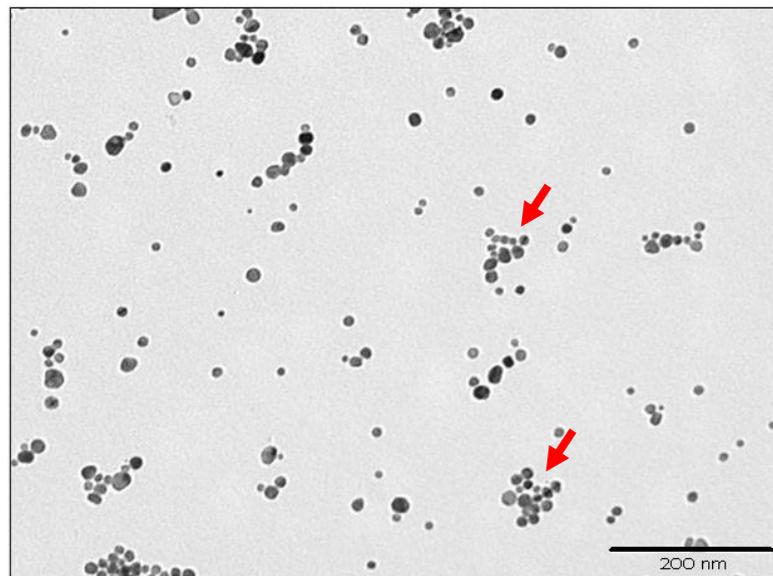
**Figura 18. Difratogramas lote 02 e 05 de AgNPs.** Valores de  $2\theta$  em  $38^\circ$ ,  $44^\circ$ ,  $64^\circ$  e  $77^\circ$  que equivalem, respectivamente, aos planos de reflexão (111), (200), (220) e (311) correspondentes a estruturas cristalinas de AgNPs.

### 5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O MET foi utilizado com o intuito de analisar a morfologia e a distribuição de tamanho das AgNPs. Visualmente, o lote 05 (figura 19) apresentou o formato esférico predominante, boa dispersão/homogeneidade e tamanhos reduzidos e o lote 02 (figura 20) também apresentou o formato esférico predominante e tamanhos reduzidos, no entanto, a população não está tão dispersa/homogênea quanto a do lote 05.

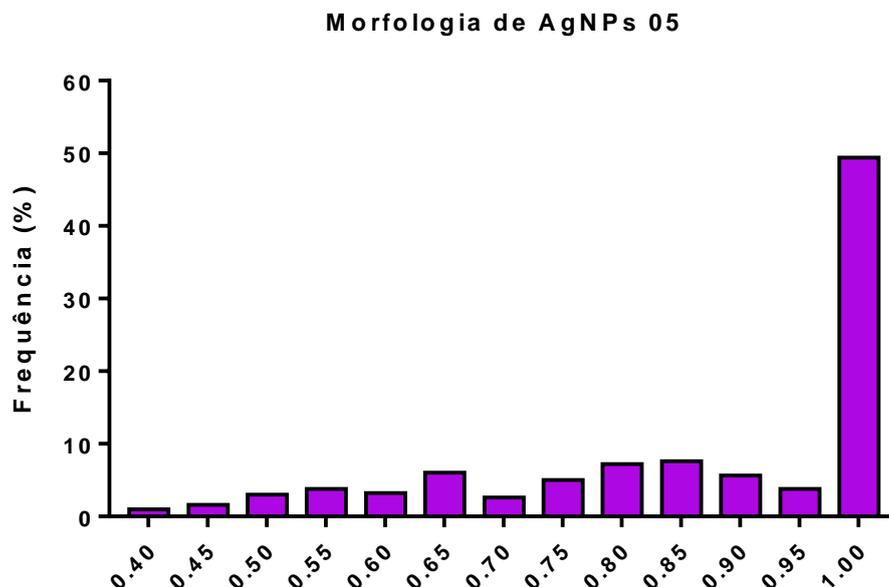


**Figura 19. Tamanho e morfologia de AgNPs (lote 05) por Microscopia Eletrônica de Transmissão.** A micrografia demonstra, que as AgNPs, visualmente, parecem apresentar a morfologia esférica, com tamanhos reduzidos e boa dispersão/homogeneidade. Escala: 500 nm.



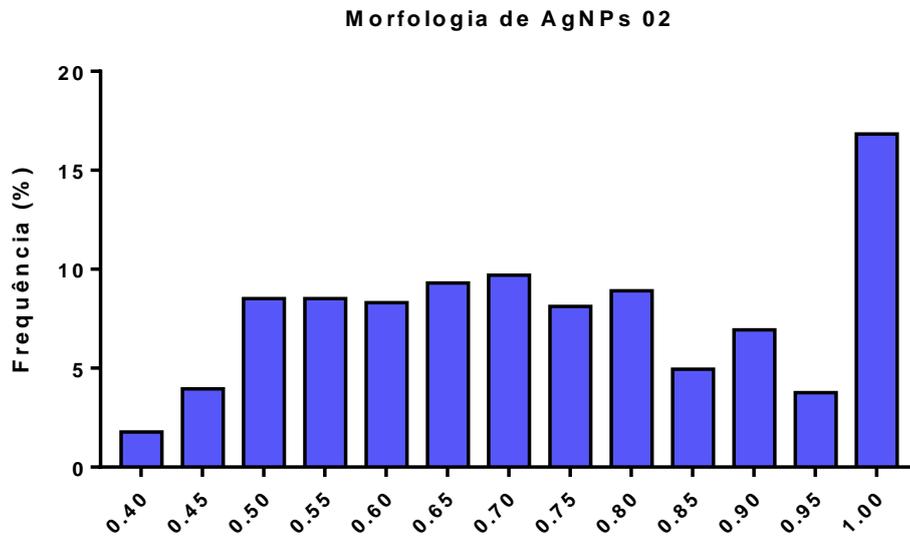
**Figura 20. Tamanho e morfologia de AgNPs (lote 02) por Microscopia Eletrônica de Transmissão.** A micrografia demonstra, que as AgNPs, visualmente, parecem apresentar a morfologia esférica, com tamanhos reduzidos, sendo possível observar aglomerados/agregados (seta vermelha). Escala: 200 nm.

Para mensurar a proximidade com o formato esférico, as imagens digitais foram analisadas pelo software ImageJ ( $n = 500$ ) no qual, o fator de circularidade foi estudado. Um valor de circularidade 1,0 representa a simetria perfeita de um círculo, enquanto os valores diferentes de 1,0 indicam morfologias que não são perfeitamente esféricas. A partir da análise realizada do lote 05 (figura 21), foi possível determinar que 50 % da população apresentou a simetria perfeita de um círculo (1,0) e 24 % ficaram entre os valores de 0,8 a 0,95 representando também, que parte da população de AgNPs possui morfologia quase esférica. O restante da população (26%) apresentou os valores entre 0,40 e 0,75, indicando afastamento do formato esférico. Portanto, de maneira geral, a população de AgNPs do lote 05 possui morfologia esférica.



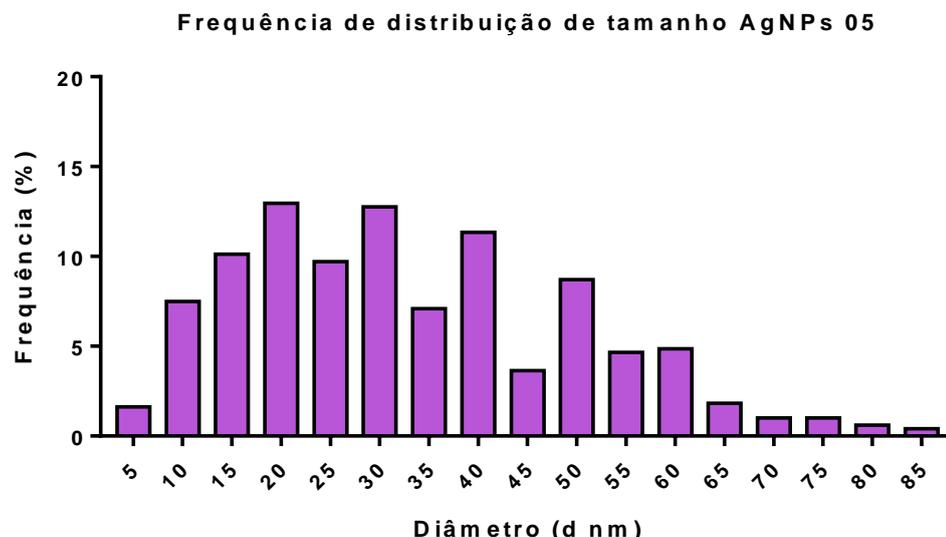
**Figura 21. Análise do fator de circularidade/forma das AgNPs lote 05:** 50 % da população apresentou a simetria perfeita de um círculo (1,0) e 24 % ficaram entre os valores de 0,8 a 0,95 representando também, que parte da população de AgNPs possuem proximidade a simetria perfeita de um círculo. O restante da população (26%) apresentou os valores entre 0,40 e 0,75, indicando afastamento do formato esférico.

Já para o lote 02 (figura 22) foi possível determinar que, 17% da população apresentou a simetria perfeita de um círculo (1,0) e 24,5 % ficaram entre os valores de 0,8 a 0,95 representando também, que parte da população de AgNPs possui proximidade a simetria perfeita de um círculo. O restante da população (58,5%) apresentou os valores entre 0,40 e 0,75, indicando afastamento do formato esférico. Portanto, de maneira geral, a população de AgNPs do lote 02 não apresentou grande parte da população com formato esférico ou próximo como a do lote 05. Nesse caso, mais da metade da população de AgNPs possui afastamento do formato esférico.

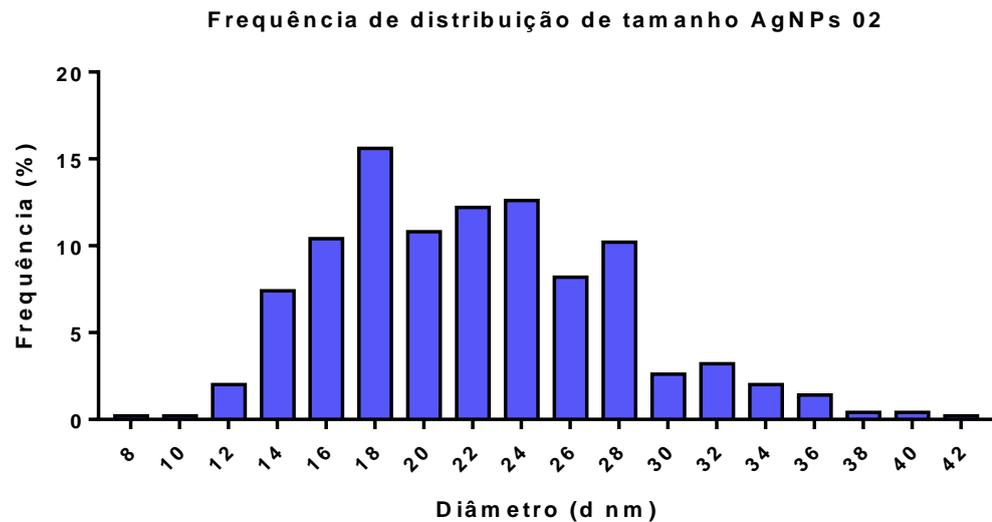


**Figura 22. Análise do fator de circularidade/forma das AgNPs lote 02:** 17% da população apresentou a simetria perfeita de um círculo (1,0) e 24,5 % ficaram entre os valores de 0,8 a 0,95 representando também, que parte da população de AgNPs possui proximidade a simetria perfeita de um círculo. O restante da população (58,5%) apresentou os valores entre 0,40 e 0,75, indicando afastamento do formato esférico.

Outro parâmetro analisado a partir das micrografias de MET pelo software ImageJ foi o diâmetro das AgNPs, com um total de 500 nanopartículas para cada lote (02 e 05). O lote 05 (figura 23) apresentou diâmetros que variaram de 5 a 85 nm, sendo 73,03 % correspondente a NP com diâmetros entre 5 a 40 nm e o restante (26,97%) entre 45 a 85 nm. Para o lote 02 (figura 24) foi possível determinar uma variação de diâmetro de 8 a 42 nm, totalizando 99,8 % da população de NP e, apenas 0,2 % apresentaram um diâmetro de 42 nm.



**Figura 23: Frequência de distribuição de tamanho de AgNPs lote 05:** O lote 05 apresenta diâmetros que variaram de 5 a 85 nm, sendo 73,03 % correspondente a NP com diâmetros entre 5 a 40 nm e o restante (26,97%) entre 45 a 85 nm.



**Figura 24: Frequência de distribuição de tamanho de AgNPs lote 02:** o lote 02 apresenta uma variação de diâmetro de 8 a 42 nm, totalizando 99,8 % da população de NP e, apenas 0,2 % com diâmetro de 42 nm.

Majoritariamente, a maior parte da população dos lotes de NP estão dentro do diâmetro almejado de acordo com o objetivo estipulado ( $30 \pm 10$  nm). Além disso, ao analisar todos os diâmetros encontrados, esses continuam dentro da escala nanométrica de 0-100 nm (ISO/TC 229). Foi possível observar também, que o lote 05 apresentou uma maior dispersão/homogeneidade sem presença de aglomerados e agregados, já o lote 02 apresentou agregados e aglomerados (setas vermelhas - figura 20). Além disso, os resultados referentes ao diâmetro médio das AgNPs corroboraram com os resultados obtidos pelo DLS.

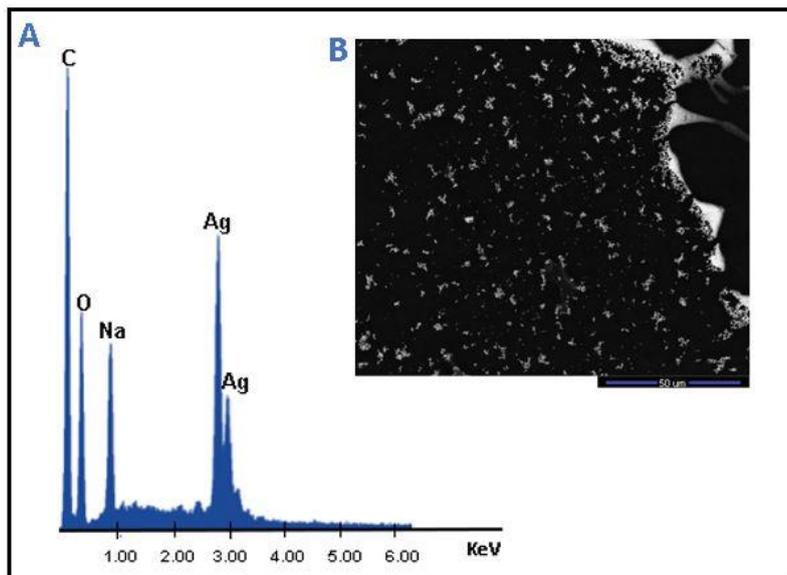
Ademais, a agregação/aglomeração das AgNPs é ocasionada, devido à alta energia superficial, que favorece termodinamicamente, a imediata agregação das NP (MELO, 2012). No entanto, o uso de estabilizadores como o PVA e TSC minimizam esse processo, mas não anulam por completo como pode ser observado de maneira mais abrangente na figura 20. Outro ponto a ser levado em consideração, é que o lote 02 apresentou menor estabilidade de acordo com os dados referentes ao potencial zeta, corroborando também, para um aumento de aglomerados/agregados.

### 5.2.5 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) com Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

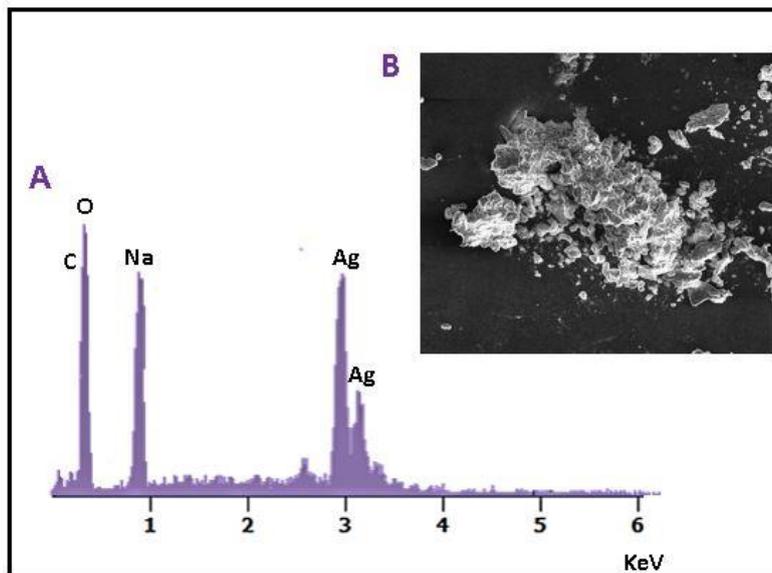
O EDS é uma das técnicas utilizadas para a identificação da composição elementar da amostra em questão, sendo fundamental para discernir se a toxicidade das NP está relacionada com a presença de possíveis elemento indesejáveis. Além disso, essas impurezas podem ser

sítios de nucleação das NP (MELO 2012). Nesse caso, o lote 02 apresentou em sua composição: Prata (Ag), Sódio (Na), Oxigênio (O) e Carbono (C) como demonstrado na figura 25 e o lote 05 exibiu a mesma composição química, em exceção do sódio (figura 26).

A natureza química foi a esperada para os dois lotes. O aparecimento do elemento carbono pode ser explicado pelo fato da amostra em pó dos lotes de AgNPs serem depositadas em *studs* previamente recobertos com fita carbono. Já, os outros elementos, foram oriundos dos reagentes utilizados para a síntese (TSC ou PVA,  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{AgNO}_3$ ).



**Figura 25. Composição química por Energia Dispersiva de Raios X do lote 02.** (A) Composição química presente no lote 02, foi de: Prata, Oxigênio, Sódio e Carbono. (B) Imagem proveniente da análise no MEV na escala de 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 26. Composição química por Energia Dispersiva de Raios X do lote 05.** (A) Composição química presente no lote 05, foi de: Prata, Oxigênio e Carbono. (B) Imagem proveniente da análise no MEV na escala de 100  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.6 Preenchimento dos critérios de caracterização e análise dos melhores parâmetros para síntese de AgNPs

Todas as análises realizadas referentes as metodologias de caracterização foram preenchidas como aprovados para os lotes 02 e 05 como pode ser observado na tabela 8. Além disso, pode ser inferido que os parâmetros utilizados para a síntese desses dois lotes foram os mais adequados (APENDICE A) frente ao protocolo padrão apresentado pelos artigos de referência para a síntese realizada, tais quais AGNIHOTRI *et al.* (2014) e MELO *et al.* (2012). Dentre os parâmetros alterados que se mostraram fundamentais no protocolo 1 foram: volume final da solução aumentado, uso de solução intermediária (soluções dos reagentes previamente diluídos), lavagem com ácido e detergente neutro (vidros ficaram sem manchas presentes, diferente dos lavados com extran), uso de lotes de reagentes novos e tempo de virada variado, ou seja, logo após a mudança da coloração das AgNPs a síntese foi finalizada (o tempo de 20 min de virada ocasionava a coloração esverdeada e leitosa na maioria dos casos). Para o protocolo 2 as modificações primordiais foram: o tempo de virada e o uso do estabilizador (logo após a mudança de coloração, há a necessidade de adicionar o estabilizador, caso contrário, o sistema de redução irá continuar e o uso do estabilizante irá demorar mais para atuar, resultando no escurecimento e, por consequência, aumento do diâmetro).

Tabela 8. Critérios de caracterização preenchidos.

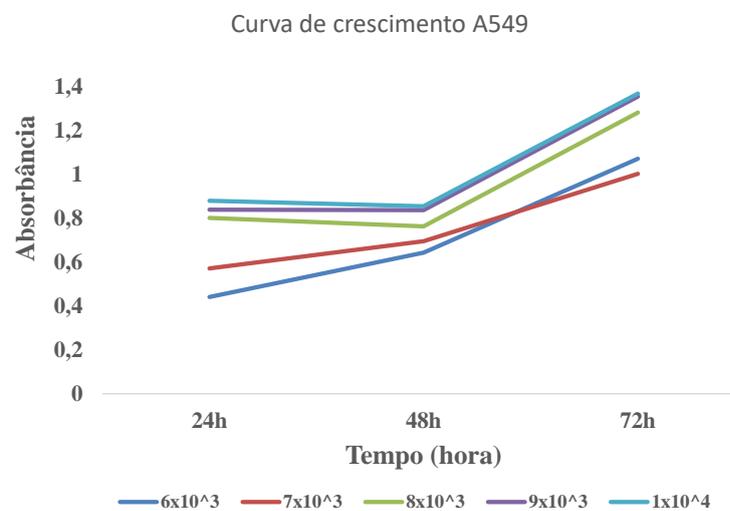
| CLASSES DE SÍNTESE | PROTOCOLOS (SUBCLASSES) | SOLUÇÕES DE AgNPs/LOTE | CRITÉRIOS DE CARACTERIZAÇÃO |                |     |     |     |     |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|
|                    |                         |                        | DLS                         | Potencial zeta | DRX | MET | MEV | NTA |
| AQUECIMENTO        | PROTOCOLO 1.1           | AgNp 02                |                             |                |     |     |     |     |
| RESFRIAMENTO       | PROTOCOLO 2             | AgNp 05                |                             |                |     |     |     |     |

## 5.3 ENSAIOS IN VITRO

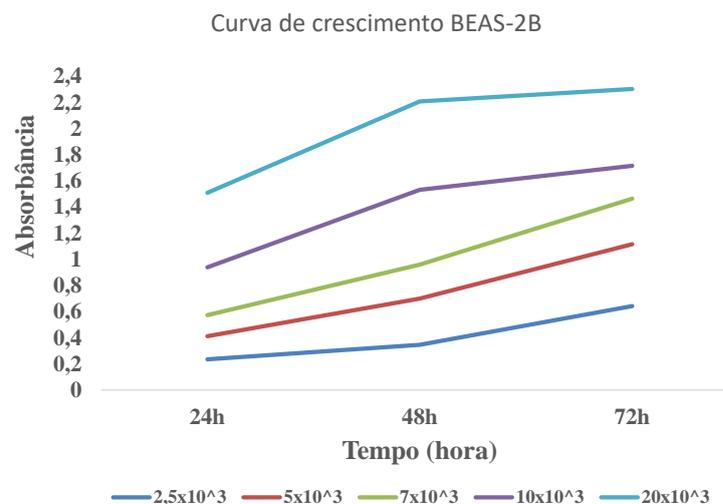
### 5.3.1 Curvas de Crescimento

A curva de crescimento foi realizada com o intuito de estipular a taxa celular proliferativa ideal para a realização dos ensaios celulares. Além disso, visando aumentar a confiabilidade do resultado, optamos por alcançar uma absorbância em 24h de 0.5 (UA), dessa forma, caso ocorra um perda de viabilidade relativa de 20 a 30% nos testes de viabilidade fica mais fácil a percepção em um gráfico e aumenta a confiabilidade por ter um crivo mais alto de

viabilidade relativa de leitura de absorvância. Na figura 27 é possível observar a taxa celular proliferativa de diferentes concentrações da linhagem A549. As concentrações de  $6 \times 10^3$  e  $7 \times 10^3$  células/poço mostraram-se adequadas para os ensaios a serem realizados em placas de 96 poços, tendo em vista não apenas o crescimento exponencial das células, mas também o fato de que nas concentrações de  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  células/poço houve o aparecimento de um platô, seguido do aumento da proliferação a partir de 48h. Finalmente, baseado na curva de crescimento realizada, optou-se pela concentração de  $7 \times 10^3$  células/poço, visto que, durante o período de 72h as células continuam em estágio proliferativo, corroborando com o tempo de tratamento com as AgNPs e com absorvância de 0,5(UA) em 24h.



**Figura 27: Curva de crescimento A549:** densidade celular de acordo com diferentes concentrações de células ( $6 \times 10^2$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$ ) no decorrer dos tempos 24h, 48h e 72h com presença de SFB (10%). A concentração de  $7 \times 10^3$  células por poço mostrou-se satisfatória para realização dos ensaios com placas de 96 poços. Experimento com uma repetição (n=1).



**Figura 28: Curva de crescimento BEAS-2B:** densidade celular de acordo com diferentes concentrações de células ( $2,5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $10 \times 10^3$  e  $20 \times 10^3$ ) no decorrer dos tempos 24h, 48h e 72h com presença de SFB (10%). A concentração de  $7 \times 10^3$  células por poço mostrou-se satisfatória para realização dos ensaios com placas de 96 poços. Experimento com uma repetição (n=1).

É possível verificar na figura 28 a taxa celular proliferativa de diferentes concentrações da linhagem BEAS-2B. As concentrações de  $5 \times 10^3$  e  $7 \times 10^3$  células/poço mostraram-se adequadas para os ensaios a serem realizados em placas de 96 poços, tendo em vista não apenas o crescimento exponencial das células, mas também o fato de que o índice celular na concentração de  $2,5 \times 10^3$  células/poço apresentou aumento da densidade celular apenas a partir de 48h e, as concentrações de  $10 \times 10^3$  e  $20 \times 10^3$  apresentaram platô após 48h. Finalmente, baseado na curva de crescimento realizada, optou-se pela concentração de  $7 \times 10^3$  células/poço, visto que, durante o período de 72h as células continuam em estágio proliferativo, corroborando com o tempo de tratamento com as AgNPs e com absorbância de 0,5(UA) em 24h.

### **5.3.2 Efeitos das AgNPs na viabilidade das linhagens celulares A549 e BEAS-2B por MTT e LDH**

A fim de verificar o potencial citotóxico de AgNPs nas linhagens celulares A549 e BEAS-2B em diferentes concentrações (10; 25; 50; 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e tempos (24, 48 e 72h), foi realizado, primeiramente, o ensaio de MTT. Os resultados referentes a A549 seguem adiante na figura 29, onde é possível observar inicialmente, no tempo de 24h, para o lote 02 redução da atividade mitocondrial nas concentrações de 75  $\mu\text{g/mL}$  ( $87,34\% \pm 3,2$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $79,27\% \pm 4,1$ ) e, para o lote 05 em 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $87,11\% \pm 2,8$ ). Após 48h houve contínua queda de atividade mitocondrial para o lote 02 em 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $87,74\% \pm 5,5$ ), 75  $\mu\text{g/mL}$  ( $78,65\% \pm 4,4$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $58,22\% \pm 2,3$ ) e, para o lote 05 em 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $65,98\% \pm 3,7$ ). Por fim, 72h após o início da exposição, a redução de atividade mitocondrial se manteve para ambos os lotes (02 e 05) para as mesmas concentrações, sendo respectivamente, 75  $\mu\text{g/mL}$  ( $75,31\% \pm 2,2$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $15,65\% \pm 4,5$ ) e 75  $\mu\text{g/mL}$  ( $77,42\% \pm 5,1$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $18,82\% \pm 1,2$ ). A partir desses dados, foi possível estipular o IC-50, no qual ambos os lotes reduziram 50% da viabilidade celular em concentrações próximas e sem diferença significativa, sendo para o lote 02 de 77,68  $\mu\text{g/mL}$  e lote 05 de 77,61  $\mu\text{g/mL}$ , representados respectivamente nas figura 30.

Conforme estabelecido na diretriz 129 da OECD (*Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*), a redução de viabilidade celular é considerada biologicamente significativa quando atinge uma diminuição de 30% (OECD, 2010). Com base nos resultados obtidos, observa-se que após 24 horas de tratamento, ambos os lotes resultaram na redução de viabilidade celular, sendo que o lote 02 apresentou uma perda maior em comparação com o lote 05. No entanto, essa diminuição não foi estatisticamente significativa do ponto de vista biológico. O fato do lote 05 apresentar uma menor resposta de

redução da viabilidade no período de 24h pode estar associado ao revestimento com o polímero de álcool polivinílico (PVA). Esse polímero pode ajudar a controlar a liberação de íons de prata das AgNPs, atuando como uma barreira física que retarda a liberação de íons de prata das AgNPs, fornecendo uma liberação mais controlada ao longo do tempo e, conseqüentemente, uma redução de viabilidade mais gradual (PENICHEVA; BRYASKOVA; KANTARDJIEV, 2012).

Ao analisar o período de 48 horas, observa-se que a concentração de 100 µg/mL nos lotes 02 e 05 apresentou significância biológica, mantendo-se significativa após 72 horas de tratamento. Portanto, é possível inferir que ambos os lotes demonstraram efeitos biológicos significativos após 48 horas de exposição e continuaram a manifestar esses efeitos após 72 horas.

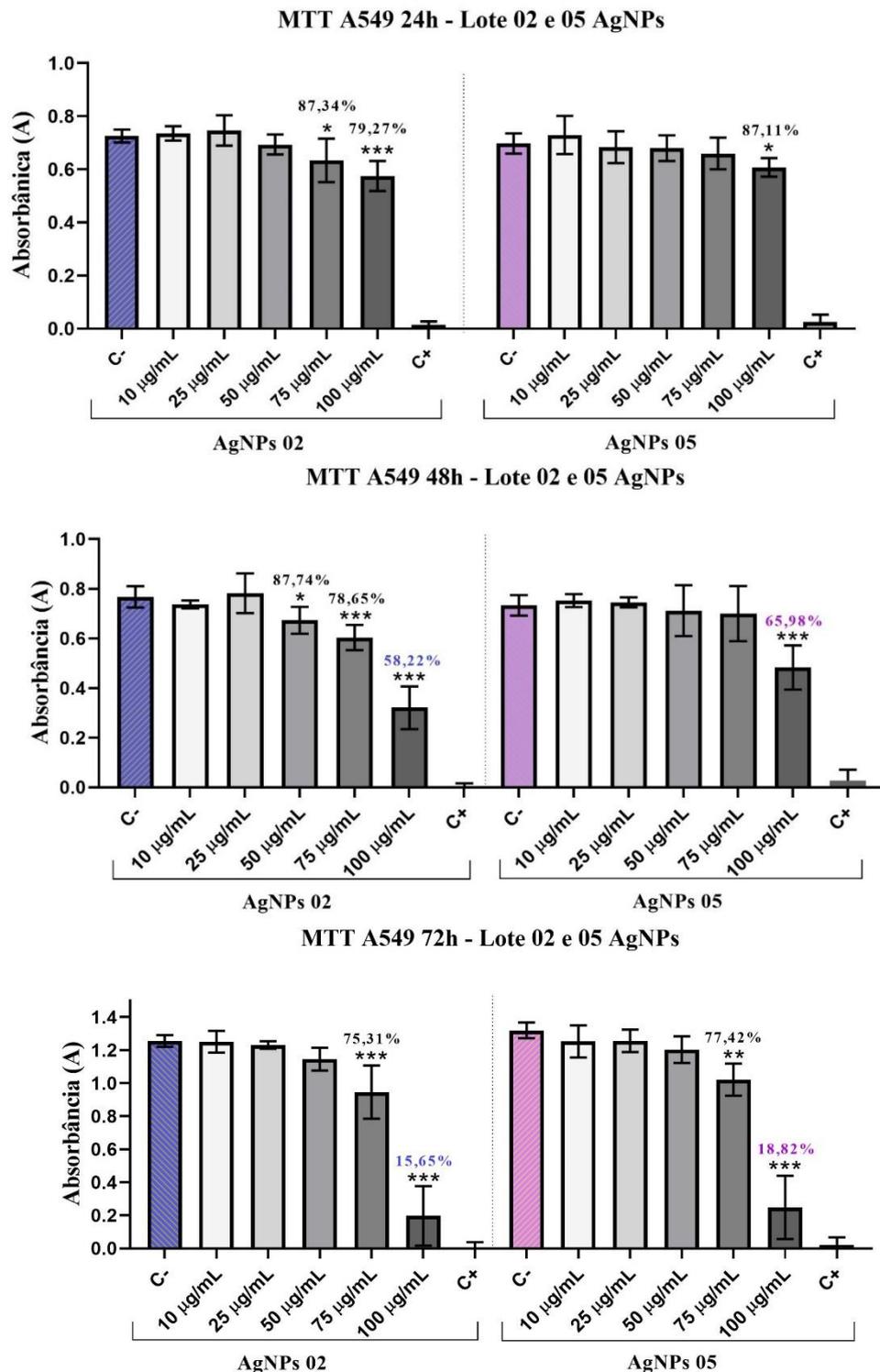
Com base nos resultados apresentados, é evidente que a redução da viabilidade celular/metabolismo mitocondrial em resposta à exposição às AgNPs é influenciada tanto pela dose quanto pelo tempo de exposição, o que está em consonância com estudos anteriores realizados por PADMINI et al. (2022), BLANCO et al. (2017), MATYSIAK-KUCHAREK; SAWICKI; KAPKA-SKRZYPCZAK (2023) e LANKOFF et al. (2012). Essa relação dose-resposta pode ser atribuída à capacidade das AgNPs de permanecerem nas células por períodos prolongados, continuando a liberar íons de prata e mantendo sua atividade citotóxica.

Por exemplo, BLANCO et al. (2017) utilizou AgNPs sintetizadas quimicamente em concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL durante 24, 48 e 72 horas, observando-se uma maior redução de viabilidade celular e IC-50 em 72 horas, especialmente na concentração de 100 µg/mL. Similarmente, MATYSIAK-KUCHAREK; SAWICKI; KAPKA-SKRZYPCZAK (2023) utilizou AgNPs sintetizadas quimicamente em concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL durante 24 e 48 horas, não observando redução significativa da viabilidade celular, exceto na concentração mais elevada (200 µg/mL), onde a viabilidade celular foi reduzida em cerca de 70%.

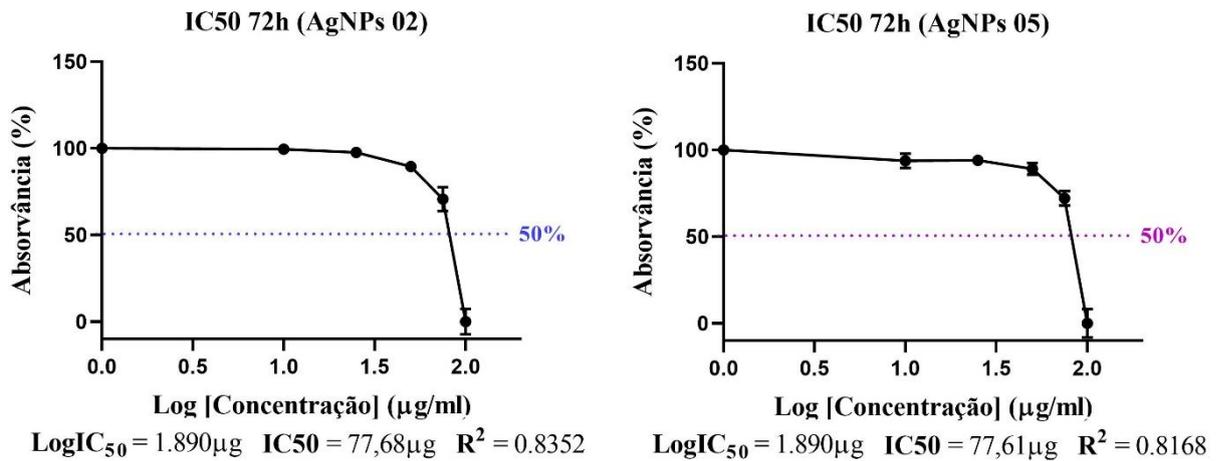
Embora esses estudos tenham utilizado concentrações e períodos de tratamento semelhantes aos do presente projeto, é importante ressaltar que a redução da viabilidade celular pode variar dependendo de fatores como tamanho, forma, concentração e revestimento das nanopartículas de prata. Portanto, as diferenças observadas entre os estudos podem ser atribuídas às variações nos métodos de síntese das AgNPs.

Dentre os estudos anteriores, BLANCO et al. (2017) demonstrou uma maior similaridade com os resultados do presente estudo, especialmente em relação à concentração de 100 µg/mL em 72 horas. Isso destaca a importância de considerar não apenas a dose e o tempo

de exposição, mas também as características específicas das nanopartículas de prata e seus efeitos na viabilidade celular.



**Figura 29. Viabilidade celular A549 por MTT:** ensaio de redução de MTT realizado em exposição da linhagem A549 às AgNPs, nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72h. Ambos os lotes de AgNPs reduziram a viabilidade celular/metabolismo mitocondrial após 48h de tratamento em 100 µg/mL. A condição DMEM (*high*) representa o controle negativo (células viáveis). O controle de morte celular foi realizado através de lise pelo uso de Triton™ X-100 0,1%. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (C-) (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).



**Figura 30. Concentração inibitória (IC-50) da A549 após exposição com AgNPs:** os dados obtidos do ensaio de MTT foram utilizados para a obtenção do IC-50. O lote 02 resultou em um IC-50 de 77,68 µg/mL e para o lote 05 77,61 µg/mL. Foram realizados três experimentos independentes.

Os resultados referentes às células BEAS-2B estão apresentados na Figura 31. Inicialmente, após 24 horas, para os lotes 02 e 05, não foi observada redução da atividade mitocondrial em nenhuma das concentrações de exposição consideradas significativas. Entretanto, após 48 horas, ocorreu uma redução progressiva na viabilidade celular para o lote 02, atingindo  $76,99\% \pm 7,7$  em 50 µg/mL,  $66,91\% \pm 6,01$  em 75 µg/mL e  $50,96\% \pm 6,7$  em 100 µg/mL, enquanto para o lote 05, os valores foram de  $90,37\% \pm 5,7$  em 10 µg/mL,  $88,76\% \pm 4,5$  em 25 µg/mL,  $80,95\% \pm 1,38$  em 50 µg/mL,  $78,27\% \pm 3,5$  em 75 µg/mL e  $70,31\% \pm 3,08$  em 100 µg/mL. Após 72 horas, a redução na atividade mitocondrial persistiu para o lote 02 em  $68,58\% \pm 7,3$  em 50 µg/mL,  $58,22\% \pm 5,2$  em 75 µg/mL e  $31,66\% \pm 3,4$  em 100 µg/mL, e para o lote 05 em  $85,81\% \pm 8,2$  em 75 µg/mL e  $74,60\% \pm 7,1$  em 100 µg/mL, permitindo estabelecer o IC50 para o lote 02 após 72 horas em 77,99 (figura 32).

Na análise do período de 48 horas, constatou-se que as concentrações de 75 e 100 µg/mL para o lote 02 e 100 µg/mL para o lote 05 apresentaram significância biológica, mantendo-se significativas após 72 horas para as concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL para o lote 02. Portanto, ambos os lotes demonstraram efeitos biológicos significativos após 48 horas de exposição, sendo que somente o lote 02 manteve a redução da viabilidade (igual ou inferior a 70%) após 72 horas.

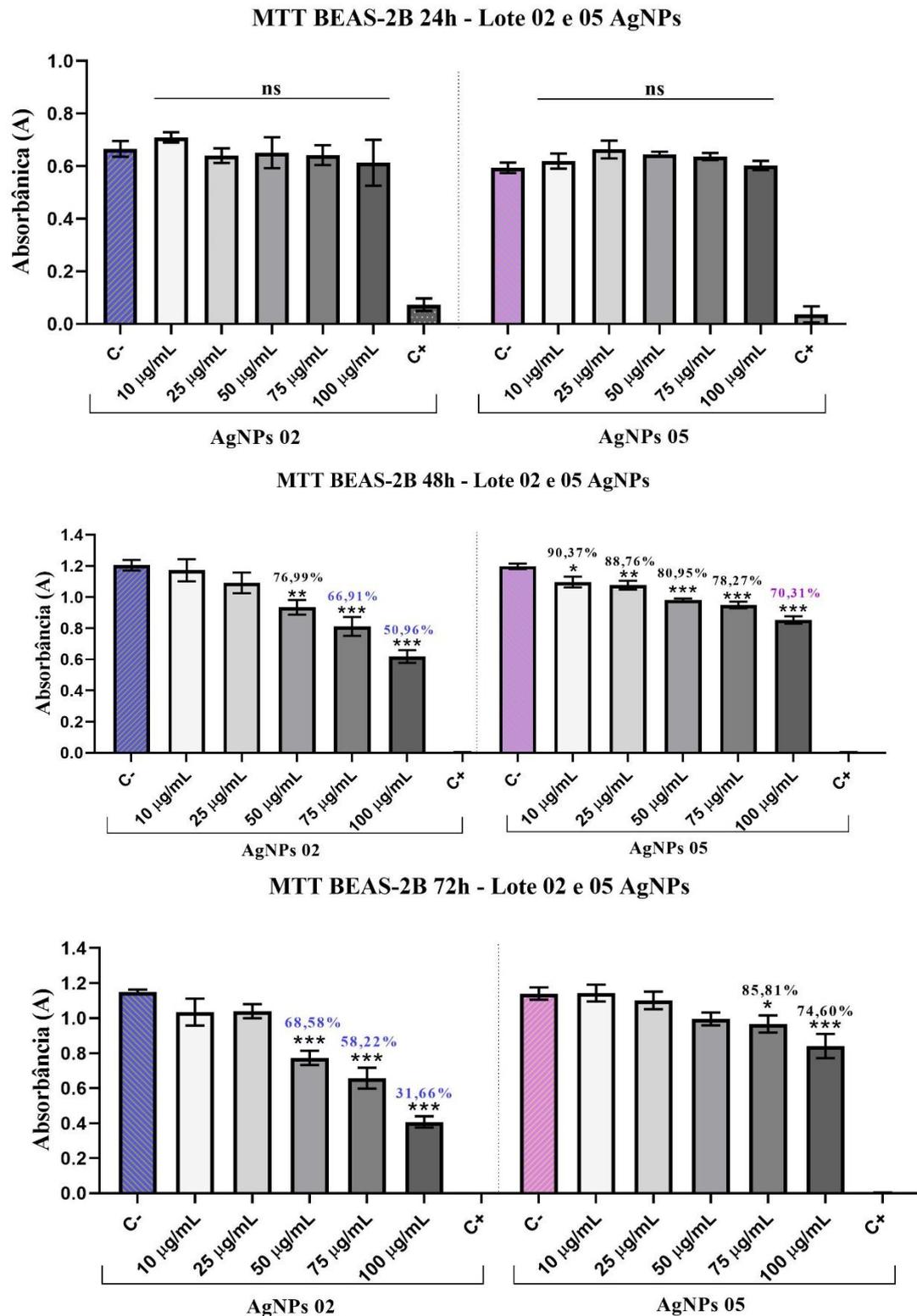
Com base nos resultados, é evidente que a redução da viabilidade celular/metabolismo mitocondrial em resposta à exposição às AgNPs é influenciada tanto pela dose quanto pelo tempo de exposição no caso do lote 02. Porém, para o lote 05, a redução na viabilidade celular não foi mantida após 72 horas de exposição às AgNPs, sugerindo uma possível capacidade de

recuperação das células BEAS-2B frente ao dano inicial causado pelas AgNPs. Essa capacidade pode ser atribuída a mecanismos de reparo celular, adaptação ao estresse ou até mesmo eliminação das AgNPs do ambiente celular. Além disso, o lote 05, é recoberto por álcool polivinílico (PVA), apresenta um maior controle de liberação de íons pelas AgNPs (PENECHEVA; BRYASKOVA; KANTARDJIEV, 2012).

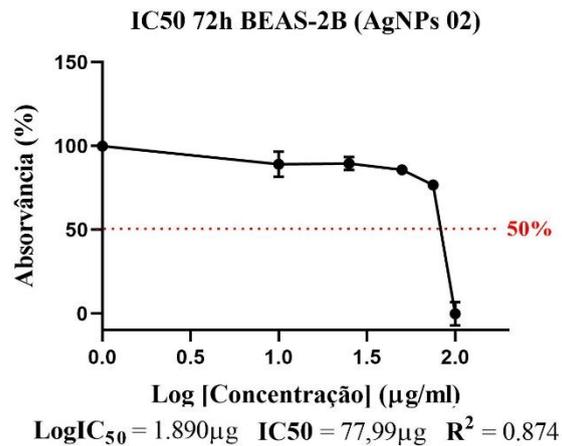
MUHAMAD et al. (2022) estudaram o efeito na viabilidade das células BEAS-2B por MTT em concentrações variadas (0 a 1000 µg/mL) e utilizando distintas AgNPs, incluindo aquelas originadas por síntese química e recobertas com PVP (polivinilpirrolidona). Seus dados relatam que essas AgNPs geram redução na viabilidade somente em concentrações acima de 250 µg/mL após 48 horas. Nossos dados corroboram com a redução de viabilidade após 48 horas de exposição, porém em concentrações mais reduzidas nos lotes 02 e 05, sendo respectivamente, 75 e 100 µg/mL.

Além disso, MUHAMAD et al. (2022) também estudaram os efeitos na viabilidade celular da A549 em comparação com a BEAS-2B e relataram as mesmas condições anteriores. Concluíram que a AgNPs obtida por síntese química resultou em redução de viabilidade em ambas as células, resultando em uma toxicidade não seletiva. Nossos dados indicam que o lote 02 apresentou redução da viabilidade progressiva dependente da dose e do período de tratamento para a célula A549 em ambos os lotes, resultando em diferença significativa após 48 horas de exposição na concentração de 100 µg/mL, mantendo-se até 72 horas. Esse padrão manteve-se para a BEAS-2B, mas nas concentrações de 75 e 100 µg/mL e, após 72 horas, nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL. Portanto, o lote 02 resultou em efeitos biológicos significativos tanto para a célula tumoral (A549) quanto para a célula normal (BEAS-2B), corroborando com a toxicidade não seletiva relatada por MUHAMAD et al. (2022). No entanto, torna-se possível notar que o lote 02 apresentou, em concentrações mais reduzidas (50, 75 e 100 µg/mL) em exposição com a BEAS-2B, indicando maior dano celular em concentrações mais reduzidas quando comparadas às mesmas condições da A549.

Em contrapartida, o lote 05 também surtiu efeito biológico frente à A549 e BEAS-2B a partir de 48 horas na concentração de 100 µg/mL. No entanto, essa redução de viabilidade só continuou para o lote 02 após 72 horas. Portanto, é possível sugerir, como citado anteriormente, que a célula BEAS-2B ativou mecanismos de reparação celular frente à exposição com as AgNPs do lote 05, resultando em uma possível toxicidade seletiva da resposta celular do lote 05 frente à exposição com A549 e BEAS-2B.



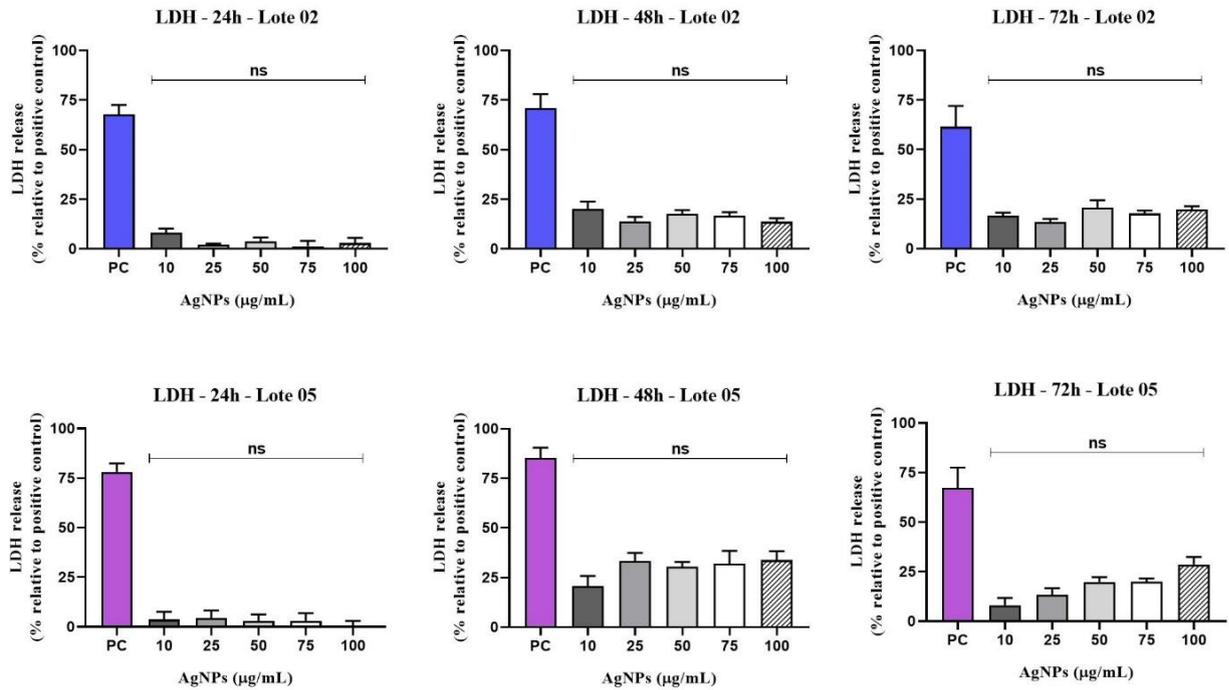
**Figura 31. Viabilidade celular BEAS-2B por MTT:** ensaio de redução de MTT realizado em exposição da linhagem BEAS-2B às AgNPs, nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72h. Ambos os lotes de AgNPs reduziram a viabilidade celular/metabolismo mitocondrial após 48h de tratamento em 100 µg/mL. A condição DMEM (*high e low*) representa o controle negativo (células viáveis). O controle de morte celular foi realizado através de lise pelo uso de Triton™ X-100 0,1%. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (C-) (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).



**Figura 32. Concentração inibitória (IC50) da BEAS-2B após exposição com AgNPs 02:** os dados obtidos do ensaio de MTT foram utilizados para a obtenção do IC-50. O lote 02 resultou em um IC50 de 77,99 µg/mL para a BEAS-2B. Foram realizados três experimentos independentes.

Em seguida, após verificarmos queda de viabilidade das células A549 pelo ensaio de redução de MTT, realizamos o ensaio de atividade de LDH com as mesmas concentrações de tratamento de AgNPs. Os resultados observados para o lote 02 e 05 na linhagem celular A549 e (Figura 33) demonstram que não houve aumento dos níveis de LDH ao compararmos as concentrações testadas com o controle positivo de morte celular, o qual apresentou alta liberação de LDH. O não extravasamento de LDH para o meio extracelular é um indicativo de que as células possam estar morrendo por apoptose e não necrose, visto que, na apoptose não há o rompimento de membrana, e sim, a formação de corpos apoptóticos.

Nosso dados corroboram com MFOU-TYNGA et al (2014), no qual relatou que até mesmo em concentrações elevadas, nesse caso de 3,23 mg/mL não há liberação significativa de LDH. No entanto, há estudos que demonstram o oposto como o de SUNDUKOV (2016) que em concentrações semelhantes ao do presente projeto (0, 10, 25, 50 e 100 mg/mL) mostraram liberação de LDH crescente no decorrer de 24 e 48h. Essa contrariedade como relatado também em outros resultados se deve, provavelmente, as diferentes características físico-químicas das AgNPs.



**Figura 33. Viabilidade celular A549 por LDH:** Ensaio de liberação de LDH realizado em exposição da linhagem A549 às AgNPs não demonstram extravasamento de LDH, indicando possível apoptose nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL, nos tempos de 24, 48, 72h. A condição PC (controle positivo) trata-se da liberação máxima de LDH. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (C-) (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). (Obs: ns – não significativo).

### 5.3.3 Monitoramento celular em tempo real por impedância elétrica

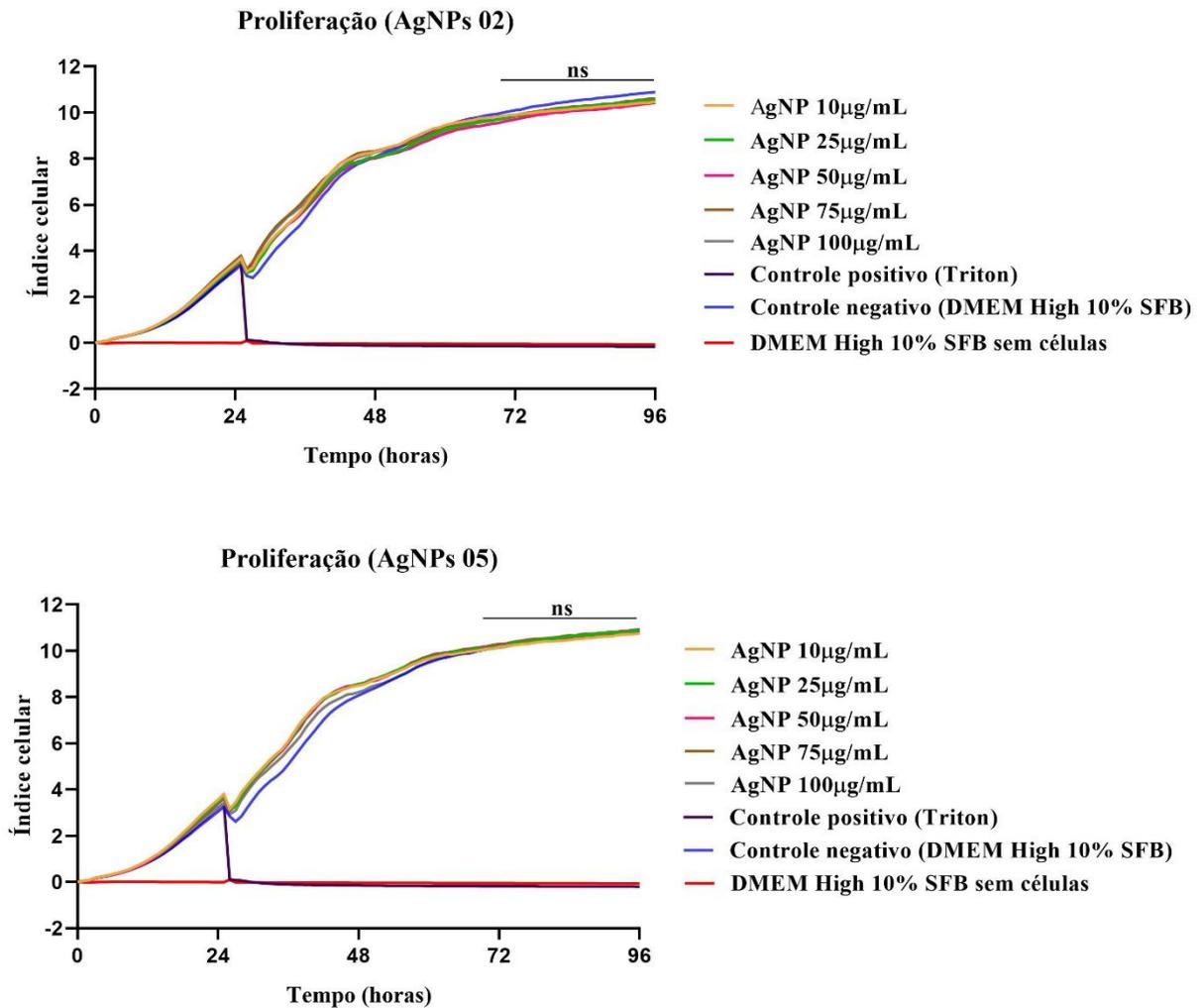
Após expor as células A549 a diferentes concentrações de AgNPs dos lotes 02 e 05 (10; 25; 50; 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), procedemos à análise da proliferação da linhagem epitelial alveolar por meio de monitoramento em tempo real da impedância elétrica. A representação gráfica da impedância elétrica, refletindo a proliferação e adesão celular, é exibida como índice celular (IC).

A figura 34 ilustra a análise dos efeitos das diversas concentrações de AgNPs na linhagem A549. O gráfico inclui oito linhas, representando cinco condições de tratamento e três de controle (DMEM high 10% SFB, como controle de células viáveis sem nanopartículas, TRITON para controle de morte celular induzida por Triton™ X100 0,1%, e DMEM 10% SFB SEM CÉLULAS, com apenas meio de cultura). O experimento teve duração de 96 horas.

No início do experimento, adicionamos  $7 \times 10^3$  células por poço. Nas primeiras horas, observamos a formação de focos de adesão, indicados pelo aumento constante da impedância devido à deposição celular nos eletrodos.

Após 24 horas, notamos uma leve queda no IC devido ao tratamento com as diferentes concentrações de AgNPs. Além disso, observamos uma significativa diminuição do índice celular no controle positivo de morte, representado em vermelho escuro, devido ao uso de Triton™ X-100 0,1%. Após 24 horas de tratamento, observamos adesão e proliferação celular, resultando em um aumento constante do índice celular. Finalmente, as células atingiram a confluência, levando à estabilização do índice celular. Ao final do experimento, não houve diferença significativa na proliferação celular em diferentes períodos de exposição (24h, 48h e 72h) às diferentes concentrações de AgNPs.

Portanto, nenhum dos lotes de AgNPs, com suas distintas concentrações, provocou alterações na proliferação/impedância celular ao longo do tempo. No entanto, estudos anteriores, como o de MOE; GABOS; LI (2013), relataram uma redução do índice celular a partir da concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs, aumentando progressivamente com o tempo de tratamento. Essa discrepância nos resultados pode ser atribuída às diferentes características físico-químicas das AgNPs, como o tamanho médio próximo a 100 nm e o revestimento orgânico utilizado no estudo de MOE; GABOS; LI (2013).



**Figura 34. Proliferação das células A549 após 24h, 48h e 72h após tratamento com AgNPs por impedância elétrica:** as AgNPs de ambos os lotes não ocasionam alterações na proliferação e adesão celular nas distintas concentrações utilizadas (10; 25; 50; 75 e 100 µg/mL). O experimento foi realizado em 96h, no qual após 24h as células foram tratadas com AgNPs para subsequente período de exposição por 72h. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (C-) (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). (Obs: ns – não significativo).

### 5.3.4 Avaliação da morte celular

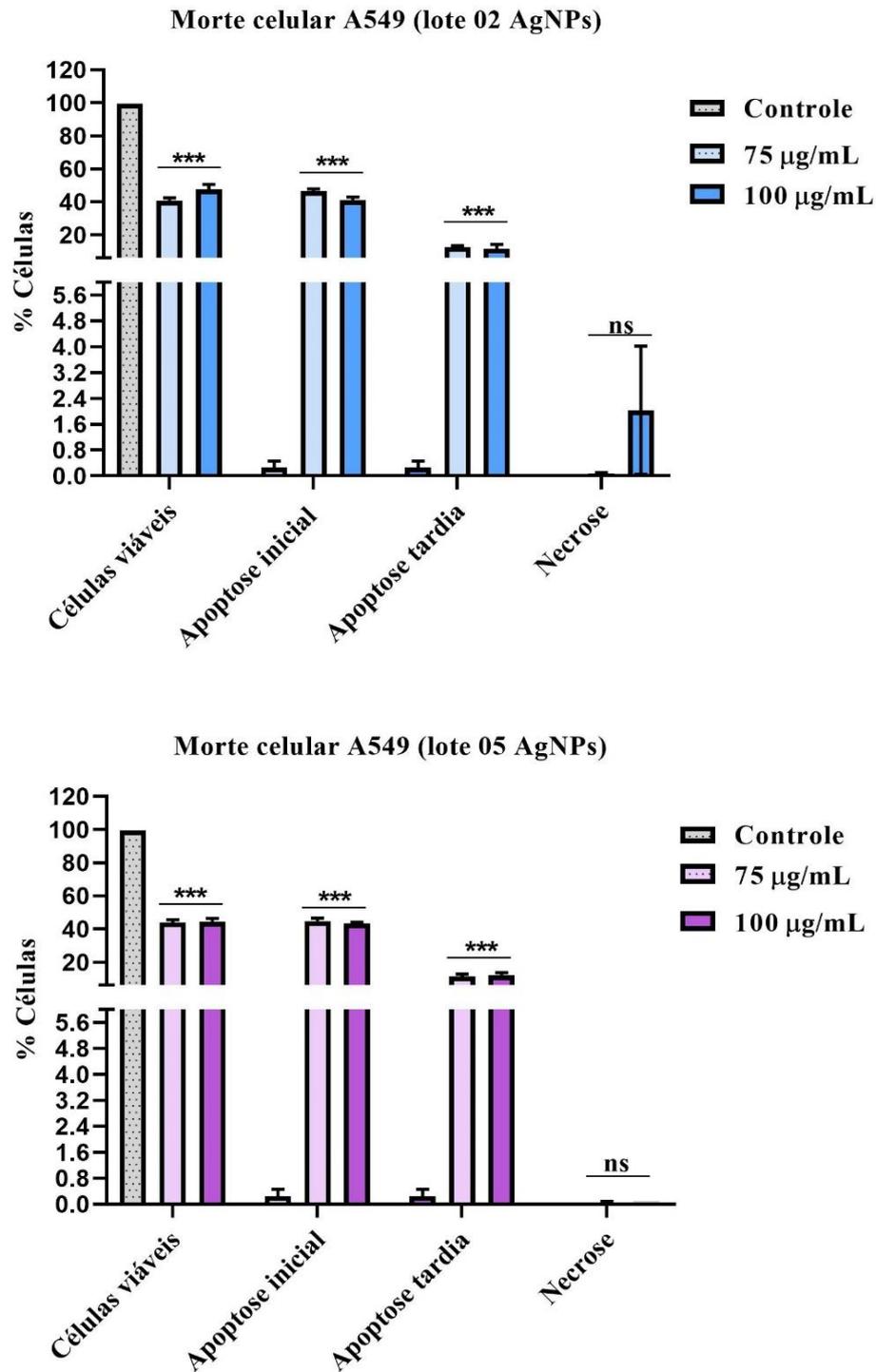
Após observarmos uma redução na viabilidade das células A549 tratadas com AgNPs (02 e 05) pelo ensaio de redução de MTT e a ausência de alteração na viabilidade pelo ensaio de liberação de LDH, decidimos investigar a possibilidade de morte celular por apoptose ou necrose. Para isso, realizamos análises por citometria de fluxo após 72 horas de tratamento com 75 e 100 µg/mL de AgNPs para ambos os lotes (Figura 35).

O lote 02 e 05 resultaram na redução da viabilidade celular/morte celular após 72h nas

concentrações de 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Para o lote 02 foi possível determinar que mesmo após a exposição de 72h com AgNPs,  $40,8 \pm 1,59$  na concentração de 75  $\mu\text{g/mL}$  e  $47,4 \pm 1,58$  na de 100  $\mu\text{g/mL}$  correspondem as células viáveis. O restante das células está sofrendo majoritariamente apoptose, no qual,  $46,5 \% \pm 1,37$  das células estão em processo de apoptose inicial e  $12,5 \% \pm 0,90$  em apoptose tardia na concentração de 75  $\mu\text{g/mL}$  e, respectivamente, para  $41,13 \% \pm 1,8$  e  $11,4\% \pm 2,7$  na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Para o lote 05 foi possível observar um padrão semelhante, sendo assim,  $43,9\% \pm 1,58$  na concentração de 75 correspondem as células viáveis,  $44,6\% \pm 1,85$  em apoptose inicial e  $11,3\% \pm 1,34$  em tardia. Para a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$   $44,4\% \pm 1,9$  correspondem as células viáveis,  $44,6\% \pm 0,55$  apoptose inicial e  $12,1\% \pm 1,4$  tardia. Em relação a necrose, nenhum dos lotes (05 e 02) em ambas as concentrações não resultaram em necrose, ressalvando o lote 02 na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  em que  $2,03\% \pm 3,4$  equivale a necrose, no entanto sem diferença significativa.

Portanto, em geral, não observamos a ocorrência de necrose, o que está em concordância com os resultados do ensaio de LDH e com estudos anteriores, como BLANCO et al. (2017) e LANKOFF et al. (2012). A liberação de LDH requer o rompimento da membrana plasmática da célula, um evento característico da necrose, não de apoptose (HAN et al., 2014). Na apoptose, embora ocorra morte celular, não há ruptura da membrana plasmática, mas sim a formação de corpos apoptóticos. Além disso, observamos que predominantemente, em ambas as concentrações e lotes de AgNPs, as células estão passando por apoptose inicial, indicando danos internos como fragmentação do DNA e condensação da cromatina. A apoptose tardia representa um estágio mais avançado do processo, em que as células já passaram pela apoptose inicial e estão prestes a se tornar corpos apoptóticos, que são posteriormente fagocitados pelo sistema imunológico (TIWARI SK et al., 2022)

Nossos resultados indicam que as AgNPs geram uma resposta celular aguda em 72 horas, com a maioria das células passando por apoptose inicial. Isso sugere uma ação rápida das AgNPs no desencadeamento do processo apoptótico, com potenciais implicações terapêuticas para o câncer. Esses achados estão alinhados com estudos anteriores, como BLANCO et al. (2017) e LANKOFF et al. (2012), embora BLANCO et al. (2017) tenha observado um aumento na apoptose tardia após 72 horas de tratamento em concentrações acima de 50  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto nossos resultados indicam predominantemente apoptose inicial após 72 horas em concentrações de 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Essa discrepância pode ser atribuída às características específicas das AgNPs utilizadas, como tamanho, forma e cargas superficiais, como discutido por LANKOFF et al. (2012), que investigou como diferentes estados de aglomeração de AgNPs podem influenciar a resposta celular, incluindo a morte celular.

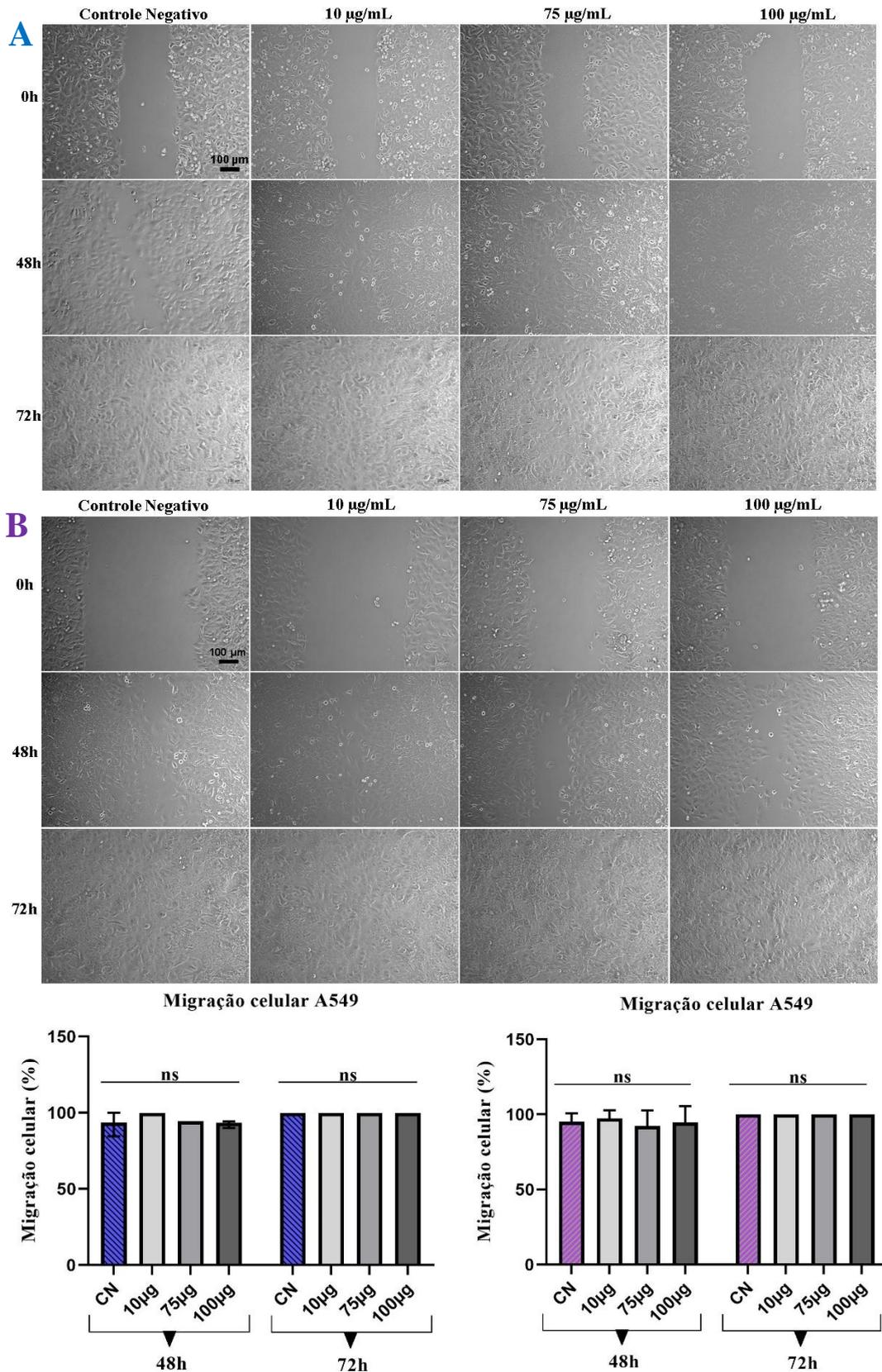


**Figura 35. Morte celular por anexina V/PI após 72h de exposição com AgNPs:** Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo utilizando o kit de Anexina V/PI, demonstrando, majoritariamente, morte celular por apoptose. Realizou-se a exposição da linhagem A549 às AgNPs, nas concentrações de 75 e 100 µg/mL após 72h. Células negativas para ambos os marcadores (Anexina V-/PI-) foram consideradas viáveis (Q3); positivas para anexina V e negativas para PI (Anexina V+/PI-), em apoptose inicial (Q4); positivas para ambos os marcadores (Anexina V+/PI+), em apoptose tardia ou necrose (Q2); e negativas para Anexina V e positivas PI (Anexina V-/PI+) em necrose (Q1). Foi realizado um experimento independente. A análise estatística foi feita através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Obs: ns – não significativo.

### 5.3.5 Efeito na migração celular

Os desafios enfrentados no tratamento do câncer de pulmão, incluindo a alta taxa de mortalidade decorrente da metástase, destacam a importância de compreender os mecanismos envolvidos na migração celular. Para investigar o impacto das nanopartículas de prata (AgNPs) nesse processo, realizamos o ensaio de recuperação de ranhura, uma abordagem que permite avaliar indiretamente a interferência das AgNPs no citoesqueleto celular e, conseqüentemente, na migração celular. Inicialmente, criamos uma abertura estreita semelhante a uma ranhura em uma monocamada celular conflúente de células A549. Posteriormente, expomos essas células a concentrações de 10, 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs por 48h e 72h.

Nossos resultados revelam que as células A549 tratadas com as AgNPs (lotes 02 e 05) não demonstraram inibição no potencial migratório após 48h e 72h de exposição em diferentes concentrações (figura 36). A análise quantitativa da migração indica que tanto no grupo controle quanto no grupo tratado, para ambos os lotes e concentrações, houve fechamento completo da ranhura após 48h e 72h. No entanto, estudos anteriores, como o de QUE et al. (2019), relatam que o potencial migratório está relacionado ao tamanho das AgNPs, destacando que nanopartículas com tamanho de 13 nm podem inibir a migração após 24h e 48h de exposição, enquanto AgNPs maiores podem aumentar a migração celular. A discrepância entre nossos resultados e os achados desse estudo pode ser atribuída ao tamanho médio das AgNPs utilizadas, bem como a outras características físico-químicas resultantes dos diferentes métodos de síntese. Esses resultados ressaltam a importância da otimização dos protocolos de síntese para alcançar os objetivos desejados no desenvolvimento de terapias baseadas em nanopartículas.



**Figura 36. Efeito na migração celular da A549 após 48h e 72h após tratamento com AgNPs:** as AgNPs de ambos os lotes nas concentrações de 10; 75 e 100 µg/mL não ocasionaram alterações no potencial migratório celular da A549, sendo possível observar as ranhuras do lote 02 em A e lote 05 em B. Foram realizados três experimentos independentes e a análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (C-) (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). (Obs: ns – não significativo). Barra de escala, 100 µm

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, foram desenvolvidos dois lotes de nanopartículas de prata (AgNPs), designados como lotes 02 e 05, que atenderam aos critérios de seleção para promover nanopartículas com potencial antitumoral efetivo. Ambos os lotes apresentaram características físico-químicas desejáveis, incluindo tamanho reduzido, boa estabilidade em água e em meios de cultura suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), estrutura cristalina confirmada e composição elementar conforme o esperado. Embora as AgNPs não tenham afetado a adesão e proliferação celular das células A549, observou-se uma redução significativa na atividade mitocondrial após 48 horas, mantendo-se essa redução após 72 horas, com IC50 para o lote 02 em 77,68  $\mu\text{g/mL}$  e para o lote 05 em 77,61  $\mu\text{g/mL}$ . Essa diminuição também foi observada nas células BEAS-2B, indicando uma possível recuperação celular frente à interação com as AgNPs do lote 05. Apesar da redução na atividade mitocondrial, não foi observado extravasamento de lactato desidrogenase (LDH) pelas células A549, sugerindo ausência de danos à membrana e indicando possível morte celular por apoptose, confirmada por ensaio de anexina V/PI. As AgNPs de ambos os lotes não reduziram a capacidade de migração celular da A549. No entanto, o lote 05 apresentou uma redução mais abrangente na atividade mitocondrial em células A549 em comparação com BEAS-2B, sugerindo uma possível toxicidade seletiva. Considerando uma terapia que não cause toxicidade às células saudáveis e que afete especificamente as células tumorais, o lote 05 mostra-se mais promissor em relação ao lote 02, destacando a influência do método de síntese nas respostas celulares. Portanto, nossos resultados contribuem para a discussão sobre o uso de AgNPs como nanomedicamentos para formulação e aprimoramento da terapia contra o câncer de pulmão, além de auxiliar na promoção da qualificação de nanomateriais.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBASI E. et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. **Crit Rev Microbiol.** p. 173-80, 2016.
- AHSAN, S. M.; RAO, C. M.; AHMAD, M. F. Nanoparticle-protein interaction: The significance and role of protein corona. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1048, p. 175–198, 2018.
- ALMEIDA, J. C. B. DE et al. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata. p. 2040–2048, 2015.
- ANJANA VN. et al. Microwave assisted green synthesis of silver nanoparticles for optical, catalytic, biological and electrochemical applications. **Artif Cells Nanomed Biotechnol.** p. 438-449, 2021.
- ANTUNES FILHO, S.; BACKX, B. P. Nanotecnologia e seus impactos na sociedade. *Revista Tecnologia e Sociedade*, v. 16, n. 40, p. 15, 2020.
- ATHIRA TR; K SELVARAJU; NL GOWRISHANKAR. Biodegradable polymeric nanoparticles: The novel carrier for controlled release drug delivery system. **International Journal of Science and Research Archive**, v. 8, n. 1, p. 630–637, 28 fev. 2023.
- AVVAKUMOVA, S. et al. Bioengineered Approaches for Site Orientation of Peptide-Based Ligands of Nanomaterials. **In: Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials.** [s.l.] Elsevier, 2018. p. 139–169.
- BAREETO G., KAJIYAMA H (2016). Nanoparticle Tracking Analysis (NTA): Contagem, Visualização e Tamanho de Nanopartículas. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/geisiufabc/webinrio-nanoparticle-tracking-analysis-nta-contagem-visualizacao-e-tamanho-de-nanopartculas>>. Acesso em: 25 abril 2023.
- BEHZADI, S. et al. Cellular Uptake of Nanoparticles: **Journey Inside the Cell.** v. 46, n. 14, p. 4218–4244, 2018.
- BENSAUDE-VINCENT, B.; SIMON, J. **Introduction. Nanotechnoscience: The end of the beginning. Philosophia Scientiae** Laboratoire d’Histoire des Sciences et de Philosophie, 2019.
- BERGERS, G.; FENDT, S. M. The metabolism of cancer cells during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 3, p. 162–180, 2021.
- BETTENCOURT, A. et al. Vitamina D e a autoimunidade na população portuguesa. **Instituto Nacional de Saúde**, v. 52, n. 4, p. 260–265, 2018.
- BIELLENBERG, D. R.; ZETTER, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. **Cancer Journal (United States)**, v. 21, n. 4, p. 267–273, 2015.
- BLANCO, J. et al. Polyvinyl pyrrolidone-coated silver nanoparticles in a human lung cancer cells: time- and dose-dependent influence over p53 and caspase-3 protein expression and epigenetic effects. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 651–666, 2017.

BRASIL. Ministério da Educação. Orientações curriculares para o ensino médio: Ciências da natureza, matemática e suas tecnologias. 2. ed. Brasília: Secretaria da Educação Básica, 2006. 135 p. Disponível em: <[http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/book\\_volume\\_02\\_internet.pdf](http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/book_volume_02_internet.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2019.

BREY, C. et al. Lung cancer related to occupational exposure: an integrative review. **Revista Gaucha de Enfermagem**, v. 41, 2020.

CÂMARA, N. L. A. DA S.; VIANA, D. DOS S. F.; VIANA, V. G. F. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata estabilizada em extrato de *Struthanthus Flexicaulis* Mart. (Erva-de-Passarinho). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e146101421983, 2021.

CAMPOS S. et al. Um caso de Carcinoma do Pulmão de Não Pequenas Células EGFR. **Revista do Grupo de Estudos do Cancro do Pulmão**, v. 19, n. 1, p. 35–40, 2022.

CARLSON, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 43, p. 13608–13619, 2008.

CARVALHO LOPES, J.; PEREIRA TORRES, M. L. Utilização de Nanopartículas no Tratamento do Câncer: Aspectos Gerais, Mecanismos de Ação Antineoplásicos e Aplicabilidades Tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 65, n. 4, 2020.

CHEN, D.; YAMADA, T. **Quantum Size Effects in Nanoscale Metallic Structures**. [s.l.: s.n.].

CONTOH, B. et al. relação entre pneumoconioses e o câncer de pulmão. **Jurnal Teknologi dan Sistem Informati Univrab**, v. 1, n. 1, p. 2019, 2019.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DE MATTEIS, V. Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. *Toxics*, v. 5, n. 4, p. 29, 17 out. 2017.

DENG, H. et al. PI3K/AKT/mTOR pathway, hypoxia, and glucose metabolism: Potential targets to overcome radioresistance in small cell lung cancer. **Cancer Pathogenesis and Therapy**, v. 1, n. 1, p. 56–66, 2023.

DOUGHTY, A. C. V. et al. **Nanomaterial applications in photothermal therapy for cancer**. *Materials* MDPI AG, 1 mar. 2019.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.

EMANUEL C.S. et al. Trabalhos nas áreas de fronteira da Química. *Atena Editora*, v. 1, p. 52–63, 2021.

EMON, B. et al. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 279–287, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, p. 38- 40/275, 2011.

GONÇALVES S. et al. Uso de formulações lipossômicas para entrega controlada de fármacos **Satukan Tekad Menuju Indonesia Sehat**, v. 2020, p. 1–12, 2020.

HADDAD, M.; SHARMA, S. Physiology, Lung. In StatPearls. StatPearls Publishing, 2020.

HAN, J. W. et al. Oxidative stress mediated cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in human lung epithelial adenocarcinoma cell line. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2014.

HARDARDOTTIR H. et al. Advances in lung cancer diagnosis and treatment - a review. **Laeknabladid**. P. 17-29, 2022.

HAROON ANWAR, S. A Brief Review on Nanoparticles: Types of Platforms, Biological Synthesis and Applications. **Research & Reviews Journal of Material Sciences**, v. 06, n. 02, p. 109–116, 2018.

HUPFFER, H. M.; LAZZARETTI, L. L. Nanotecnologia e Sua Regulamentação No Brasil. *Revista 55 55 Gestão e Desenvolvimento*, v. 16, n. 3, p. 153–177, 2019.

ILIĆ, K. et al. Interaction of Differently Coated Silver Nanoparticles With Skin and Oral Mucosal Cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 5, p. 2250–2261, 2021.

INCA (Instituto Nacional do câncer) 2018 - 2020. Tudo sobre o Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil [s.l: s.n.].

**ISO - ISO/TS 80004-2:2015 - Nanotechnologies – Vocabulary - Part 2: Nano-objects**. Disponível em: Acesso em: 16 fev. 2024.

JIANG L, SANTIAGO I, FOORD J. High-Yield Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles by Enzyme-Modified Boron-Doped Diamond Electrodes. **Langmuir**. p. 6089-6094, 2020.

KANG H. et al. Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities. **Chem Rev**. p. 664-699, 2019.

KHURSHEED, R. et al. **Biomedical applications of metallic nanoparticles in cancer: Current status and future perspectives**. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson s.r.l., , 1 jun. 2022.

KLEIN, C. L. et al. **NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity**. [s.l: s.n.].

LOOS, Mário Rodrigo. Nanociência e nanotecnologia: Compósitos Termofixos Reforçados

com Nanotubos de Carbono. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2014.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. **Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry**. *Molecules*. 22 jan. 2023.

MARQUES, E. F. Da nanociência à nanotecnologia. p. 1–7, 2014.

MATYSIAK-KUCHAREK, M.; SAWICKI, K.; KAPKA-SKRZYPCZAK, L. Effect of silver nanoparticles on cytotoxicity, oxidative stress and pro-inflammatory proteins profile in lung adenocarcinoma A549 cells. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 30, n. 3, p. 566–569, 2023.

MCKLEROY, W.; LYN-KEW, K. 500 million alveoli from 30,000 feet: A brief primer on lung anatomy. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1809p. 3–15.

MELO, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MELO, R. L. F. et al. As nanopartículas como ferramentas biológicas: uma revisão exploratória. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. e363974155, 17 maio 2020.

MFOUO-TYNGA, I. et al. Photodynamic ability of silver nanoparticles in inducing cytotoxic effects in breast and lung cancer cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, n. 1, p. 3771–3780, 2014.

MOE, B.; GABOS, S.; LI, X. F. Real-time cell-microelectronic sensing of nanoparticle-induced cytotoxic effects. *Analytica Chimica Acta*, v. 789, p. 83–90, 2013.

MOUSAVI SM. Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018.

MUHAMAD, M. et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Biogenic Silver Nanoparticles in A549 and BEAS-2B Cell Lines. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v. 2022, 2022.

NASIR A. et al. Nanotechnology, A Tool for Diagnostics and Treatment of Cancer. *Curr Top Med Chem*. p. 1360-1376, 2021.

NEVES, M. T. et al. Uso da tecnologia de lipossomas no encapsulamento de compostos bioativos - Revisão. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 7, n. 4, 18 out. 2021.

NOORELDEEN, R.; BACH, H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 16, 2021.

OECD. Test Guideline No. 129: Guidance document on using cytotoxicity test to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. *OECD Guidelines for the Testing Chemicals*, v. July, n. 129, p. 1–54, 2010.

OPAS (Organização Nacional Pan-Americana da Saúde) 2018. Câncer. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em 10 jan. 2024.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). at: Accessed 11 dez. 2023.

PADMINI, R. et al. Cytotoxic effect of silver nanoparticles synthesized from ethanolic extract of *Allium sativum* on A549 lung cancer cell line. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 4, 2022.

PARKER, A. L. et al. Extracellular matrix profiles determine risk and prognosis of the squamous cell carcinoma subtype of non-small cell lung carcinoma. **Genome Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–29, 2022.

PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV, T. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNPss) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 7, p. 2048–2051, 2012.

PINHEIRO, J. M. DA S.; PANDOLI, O. Síntese de nanopartículas de prata em fluxo contínuo como fonte de substratos para a análise SERS (Surface Enhanced Raman Scattering). p. 1–21, 2015.

PITREZ, F. A. B. et al. Metástase, uma visão atualizada. **Revista Brasileira De Cancerologia**, 41(2), 81–87, 2023.

POMPEU, L. D. et al. Nanotecnologia aplicada à oncologia: uma perspectiva sobre o tratamento do câncer utilizando óxido de grafeno. **Disciplinarum Scientia - Ciências Naturais Tecnológicas**, v. 22, n. 2, p. 39–52, 2021.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Nanopartículas de prata: mecanismo de ação antimicrobiana, síntese, aplicações médicas e efeitos de toxicidade. p. 1–10, 2012.

PRIYA SWETHA, P. D.; MANISHA, H.; SUDHAKARAPRASAD, K. **Graphene and Graphene-Based Materials in Biomedical Science. Particle and Particle Systems Characterization** Wiley-VCH Verlag, 1 ago. 2018.

QUE, Y. M. et al. Size dependent anti-invasiveness of silver nanoparticles in lung cancer cells. **RSC Advances**, v. 9, n. 37, p. 21134–21138, 2019.

RASHID, S. Hallmarks of Cancer Cell. Em: **Cancer and Chemoprevention: An Overview**. [s.l.] Springer Singapore, 2017. p. 3–13.

REZVANI, E. et al. Efeitos adversos do nanoprata na saúde humana e no meio ambiente. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 145–159, 2019.

RIGHI L, VOLANTE M, PAPOTTI M. Small-Cell Carcinoma of the Lung: What We Learned about It? **Acta Cytol**.p. 257-268, 2022.

RUARO, B. et al. The history and mystery of alveolar epithelial type ii cells: Focus on their physiologic and pathologic role in lung. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–16, 2021.

SAMAN, H. et al. Inducing angiogenesis, a key step in cancer vascularization, and treatment approaches. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2020.

SANAEI, M. J. et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles. **Translational Oncology**, v. 18, n. February, p. 101364, 2022.

SANTOS, J. F. L. et al. Ressonância de Plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Quimica Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098–1111, 2016.

SETHI, P. Cancer : A Small Review. p. 1–2, 2021.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada. 7 ed. 960 p. ISBN 9788582714034; Artmed, 2017.

SINGH, V. et al. Applications of nanoparticles in various fields. **Diagnostic Applications of Health Intelligence and Surveillance Systems**, n. December, p. 221–236, 2021.

SKOULIDIS, F.; HEYMACH, J. V. Co-occurring genomic alterations in non-small cell lung cancer biology and therapy. Public Access. **Nature Reviews, Cancer**, v. 19, n. 9, p. 30, 2019. .

SRINIVAS, K. Kurapati Srinivas. Need of Nanotechnology in Education. **Science Journal of Education**, v. 2, n. 2, p. 58–64, 2014

SUDHA, P. N. et al. Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. In: **Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures**. Elsevier. p. 341–384, 2018.

SUNDUKOV, Y. N. First record of the ground beetle *Trechoblemus postilenatus* (Coleoptera, Carabidae) in Primorskii krai. **Far Eastern Entomologist**, v. 165, n. April, p. 16, 2006.

TEIXEIRA, C. E. Sobre a teoria da difração de raios-X em estruturas tridimensionais. p. 142, 2014.

TENG, J. P. et al. Gemcitabine and cisplatin for treatment of lung cancer in vitro and vivo. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p. 3819–3825, 2018.

TIWARI SK. et al. Quantitative analysis of apoptosis and necrosis in live cells using flow cytometry. **Methods mol biol**. P. 57 – 69, 2022.

TONET, M. D.; LEONEL, A. (2019). Nanociência e Nanotecnologia: uma revisão bibliográfica acerca das contribuições e desafios para o ensino de Física. *Caderno Brasileiro de Ensino de Física*, 36(2), 431–456. doi:10.5007/2175-7941.2019v36n2p431.

WANG, J. et al. Genetic predisposition to lung cancer: Comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2023. Câncer de pulmão. Disponível em:<

[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer?gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiArLyuBhA7EiwA-qo80MioLnabnyyc3dsIT7O-1C427P6fNudMFIJXh26dF9UETG\\_7LYzMfBoCrzsQAvD\\_BwE](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer?gad_source=1&gclid=CjwKCAiArLyuBhA7EiwA-qo80MioLnabnyyc3dsIT7O-1C427P6fNudMFIJXh26dF9UETG_7LYzMfBoCrzsQAvD_BwE)>. Acesso em: 24 jan. 2024.

WU, F. et al. Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2021.

ZHANG, D. et al. Mechanochemistry in cancer cell metastasis. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 1, p. 7–14, 2018

## APÊNDICE A

Tabela 3: informações sobre a síntese de AgNPs.

| SÍNTESE QUÍMICA POR REDUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) |                         |                         |                                  |                     |  |                   |                                 |             |     |                    |                   |  |                            |                       |                 |
|--|-------------------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------|--|-------------------|---------------------------------|-------------|-----|--------------------|-------------------|--|----------------------------|-----------------------|-----------------|
| CLASSE DE SÍNTESE  | PROTOCOLOS (SUBCLASSES) | SOLUÇÕES/LOTES DE AgNPs | ALTERAÇÕES                       |                     |  |                   |                                 |             |     |                    |                   |  |                            |                       |                 |
|  |                         |                         | CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES Mol/L |                     |  | VOLUME FINAL (ml) | LAVAGEM                         | GOTEJAMENTO | pH  | LOTE DOS REAGENTES |                   |  | TEMPO DE VIRADA (min)      | SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA | DATA DA SÍNTESE |
|  |                         |                         | AgNO <sub>3</sub>                | NaBH <sub>4</sub>   | Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> |                   |                                 |             |     | AgNO <sub>3</sub>  | NaBH <sub>4</sub> | Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> |                            |                       |                 |
| AQUECIMENTO  | PROT. 1                 | AgNPs 01                | 1x10 <sup>-3</sup>               | 1x10 <sup>-3</sup>  | 1,06x10 <sup>-3</sup>  | 50                | Extran                          | Sim         | Sim | 209139-25G         | 45283-23G         | SLBH5171V  | 20                         | N/A                   | 31/05/2022      |
|  | PROT. 1.1               | AgNPs 02                | 100x10 <sup>-3</sup>             | 10x10 <sup>-3</sup> | 10x10 <sup>-3</sup>  | 788               | Ácido sulfonídrico e detergente | Sim         | N/A | 209139-25G         | 45283-23G         | BCCG934  | Logo após a mudança de cor | Sim                   | 08/11/2022      |
|  | PROT. 1.2               | AgNPs 03                | 1x10 <sup>-3</sup>               | 1x10 <sup>-3</sup>  | 1,06x10 <sup>-3</sup>  | 50                | Extran                          | Não         | 10  | 209139-25G         | 45283-23G         | SLBH5171V  | 20                         | N/A                   | 31/05/2022      |
|  | PROT. 1.3               | AgNPs 04                | 1x10 <sup>-3</sup>               | 1x10 <sup>-3</sup>  | 1,06x10 <sup>-3</sup>  | 100               | Ácido sulfonídrico e detergente | Sim         | N/A | 209139-25G         | 45283-23G         | BCCG934  | 20                         | N/A                   | 15/06/2022      |

| SÍNTESE QUÍMICA POR REDUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) |                         |                         |                            |                           |                                     |                   |  |                                |             |                    |                   |                                     |                          |                 |
|--|-------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|--|--------------------------------|-------------|--------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| CLASSE DE SÍNTESE  | PROTOCOLOS (SUBCLASSES) | SOLUÇÕES/LOTES DE AgNPs | ALTERAÇÕES                 |                           |                                     |                   |  |                                |             |                    |                   |                                     |                          |                 |
|  |                         |                         | CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES |                           |                                     | VOLUME FINAL (ml) | LAVAGEM                                | ESTABILIZADOR                  | GOTEJAMENTO | LOTE DOS REAGENTES |                   |                                     | TEMPO DE VIRADA (min)    | DATA DA SÍNTESE |
|  |                         |                         | AgNO <sub>3</sub> (mol/l)  | NaBH <sub>4</sub> (mol/l) | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O (%) |                   |  |                                |             | AgNO <sub>3</sub>  | NaBH <sub>4</sub> | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O (%) |                          |                 |
| RESFRIAMENTO   | PROT. 2                 | AgNPs 05                | 1x10 <sup>-3</sup>         | 2x10 <sup>-3</sup>        | 0,30%                               | 200               | Ácido sulfonídrico e detergente neutro | PVA logo após a mudança de cor | Sim         | 209139-25G         | 45283-23G         | P613666                             | Logo após mudança de cor | 08/11/2022      |
|  | PROT. 2.1               | AgNPs 06                | 1x10 <sup>-3</sup>         | 2x10 <sup>-3</sup>        | N/A                                 | 100               | Ácido sulfonídrico e detergente        | N/A                            | Sim         | 209139-25G         | 45283-23G         | N/A                                 | 10                       | 06/07/2022      |
|  | PROT. 2.2               | AgNPs 07                | 1x10 <sup>-3</sup>         | 2x10 <sup>-3</sup>        | 0,30%                               | 75                | Ácido sulfonídrico e detergente neutro | PVA após tempo de virada       | N/A         | 209139-25G         | 45283-23G         | P613666                             | 5                        | 07/07/2022      |
|  | PROT. 2.3               | AgNPs 08                | 1x10 <sup>-3</sup>         | 2x10 <sup>-3</sup>        | N/A                                 | 75                | Ácido sulfonídrico e detergente        | N/A                            | N/A         | 209139-25G         | 45283-23G         | N/A                                 | 10                       | 07/07/2022      |

**Legenda:** N/A (Não aplicável); AgNO<sub>3</sub> (Nitrato de prata); NaBH<sub>4</sub> (Borohidreto de sódio); Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (Citrato trissódico); C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O (Álcool polivinílico – PVA) e Prot. (protocolo). Foram realizados três experimentos independentes.