



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do
tubérculo de *Curcuma longa* associadas à quitosana e avaliação da
atividade antitumoral *in vitro* em câncer de pele não melanoma
(linhagem A431).**

ALICIA SIMALIE OMBREDANE

2016

ALICIA SIMALIE OMBREDANE

Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* L. associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em câncer de pele não melanoma (linhagem A431).

ORIENTADORA:

PROFA. DRA. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BRASÍLIA, DF
2016

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Jean-Claude e Nathaly, meu irmão Nicolas e minha cunhada Dan, pelo amor e carinho que atravessam as fronteiras.

Ao Herdson, amigo, confidente, companheiro de todas as horas. Obrigada pelo amor, paciência, compreensão e incentivo.

Aos meus orientadores Graziella Anselmo Joanitti, Luciano Paulino da Silva e Vera Lúcia Perussi Polez. Muito obrigada pelos ensinamentos científicos valiosos, pela paciência e dedicação e pela amizade. O amor pela ciência que cada um de vocês demonstrou ao longo dos anos de trabalho em conjunto serviu como base e incentivo para o meu crescimento acadêmico.

Ao Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes, pelas análises por microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Diego Juscelino Santos Dias, pelas análises por espectroscopia de infravermelho.

À Cíntia Caetano Bonatto, pelas análises por espectrometria de massa MALDI/TOF e auxílio na otimização da síntese.

Ao responsável do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, o Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a todos os professores e colegas que propiciaram um ambiente de trabalho agradável e unido.

Ao responsável do Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos, o Dr. Thales Lima Rocha, pelos conselhos, apoio e amizade e aos colegas, pela amizade e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia e Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, pelo apoio, discussão e amizade.

Aos amigos da Universidade Católica de Brasília que sempre compartilharam as frustrações e felicidades.

Aos amigos não científicos que, apesar de não fazerem parte do mundo científico, entendem os desafios encontrados ao longo do caminho.

Ao Dr. Roberto Fontes Vieira, a Prof. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro e ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa pela participação como membros da banca examinadora.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e à Universidade de Brasília pela infraestrutura onde foi realizado todo o trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, EMBRAPA e FAP-DF, pelo suporte financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho.

*“Je crois que l’avenir de l’humanité est dans
le progrès de la raison par la science.”*

Emile Zola (1840-1902)

(“Eu acredito que o futuro da humanidade se encontra no progresso da razão pela ciência”)

RESUMO

O câncer de pele não melanoma (CPNM) é o tipo de tumor de maior incidência no Brasil, e o subtipo maligno denominado de carcinoma epidermoide representa 70% das mortes por CPNM. Os tratamentos convencionais apresentam grande chance de cura, entretanto, são geralmente associados a vários efeitos colaterais adversos localizados e/ou sistêmicos. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é de grande interesse. O uso de compostos naturais e de nanopartículas de prata (AgNPs) demonstram uma grande relevância para o tratamento de vários tipos de câncer. Adicionalmente, a síntese verde de AgNPs consiste em utilizar organismos biológicos e/ou biomoléculas isoladas como agentes redutores e estabilizantes. Portanto, o método de síntese se torna mais eco-amigável, de menor custo e biocompatível. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é de sintetizar AgNPs utilizando extrato aquoso (EA) do tubérculo de açafrão (*Curcuma longa*) e nitrato de prata (AgNO₃), associá-las com polímeros de quitosana, caracterizá-las, avaliar a citotoxicidade em células tumorais de CPNM (A431) e não tumorais (queratinócitos - HaCAT) e investigar seus possíveis mecanismos de ação em linhagem de CPNM (A431), *in vitro*. O rendimento da síntese de AgNPs foi dependente da variação de temperatura de armazenamento da *C. longa*, do método de extração, da temperatura de síntese e da concentração de EA e de AgNO₃. Após a otimização da síntese (*C. longa* armazenada a temperatura ambiente, extração por fervura, síntese a 75°C por 24 horas com 2 mg/mL de EA e 1 mM de AgNO₃) a quitosana foi utilizada para recobrir as AgNPs devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade. As AgNPs obtidas apresentaram uma homogeneidade e estabilidade coloidal moderadas (Pdl de 0,319 ± 0,043 e potencial Zeta de -24,8 ± 2,2 mV) com diâmetro hidrodinâmico (DH) de 210,3 ± 57,1 nm. Em paralelo, as AgNPs recobertas por quitosana (CH-AgNPs) apresentaram DH de 328,0 ± 61,6 nm, moderada homogeneidade (Pdl de 0,372 ± 0,059) e estabilidade coloidal (potencial Zeta de +53,9 ± 3,1 mV). A forma das nanopartículas foi avaliada por técnicas de microscopia. As amostras demonstraram ser estáveis por 30 dias a 4°C. Além disso, ambas demonstraram atividade citotóxica dose-dependente em células A431 e HaCAT. A investigação dos possíveis mecanismos de ação das AgNPs expostas às células A431 por 24 horas a 50µM demonstrou a indução de lesão de membrana plasmática (50%), diminuição da proliferação celular (50%), aumento da taxa de fragmentação de DNA (40%) e do potencial de membrana mitocondrial. Além disso, as CH-AgNPs bloquearam as células em fase G1 do ciclo celular e apresentaram maior marcação por Anexina-V, sugerindo morte celular por apoptose. Em suma, pode-se concluir que a síntese verde demonstrou ser uma boa alternativa para a obtenção de AgNPs com grande potencial citotóxico. A associação com a quitosana pode representar um potencial promissor para o tratamento de CPMN. **Palavras-chave:** síntese verde, nanopartículas de prata, *Curcuma longa*, câncer de pele não melanoma

ABSTRACT

Nonmelanoma skin cancers (NMSC) represents the most incident tumor in Brazil, and the malignant subtype squamous cell carcinoma accounts for 70% of deaths from NMSC. Conventional treatments have great chance of cure, however, they are usually associated with several localized and/or systemic adverse side effects. Therefore, the development of new therapeutic strategies is of great interest. The use of natural compounds and silver nanoparticles (AgNPs) showed a great importance for the treatment of various cancers. Additionally, the green synthesis of AgNPs consists of using biological organisms and/or biomolecules isolated as reducing agents and stabilizers. Therefore, this method of synthesis becomes more eco-friendly, less costly and biocompatible. Given the above, the objective of this study is to synthesize AgNPs using aqueous extract (EA) of turmeric tuber (*Curcuma longa*) and silver nitrate (AgNO_3), associate them with chitosan polymers, characterize them, analyze the cytotoxicity NMSC tumor (A431) and non-tumor cells (keratinocytes - HaCaT) and investigate the possible mechanisms of action in NMSC cells line (A431) *in vitro*. The yield of synthesis was dependent on the variation of the storage temperature of *C. longa*, the method of extraction, the temperature of synthesis and the concentration of EA and AgNO_3 . After optimization of the synthesis parameters (*C. longa* stored at room temperature, extraction by boiling, and synthesis at 75°C for 24 hours with 2 mg/ml EA and 1 mM AgNO_3) chitosan was used to coat AgNPs due to its properties of biocompatibility, biodegradability and bioadhesiveness. The obtained AgNPs showed a moderate homogeneity and colloidal stability (0.319 ± 0.043 PDI and Zeta potential of -24.8 ± 2.2 mV) with hydrodynamic diameter (HD) of 210.3 ± 57.1 nm. In parallel, covered with chitosan (CH-AgNPs) exhibited HD of 328.0 ± 61.6 nm, moderate homogeneity (PDI 0.372 ± 0.059), and colloidal stability (Zeta potential of $+53.9 \pm 3.1$ mV). The shape of the nanoparticles was analyzed by microscopy techniques. The samples proved to be stable for 30 days at 4°C. In addition, both showed dose-dependent cytotoxic activity in HaCaT and A431 cells. The investigation of possible mechanisms of action of AgNPs exposed to A431 cells for 24 hours at 50 μM demonstrated the induction of plasma membrane injury (50%), reduction of cell proliferation (50%), increased of DNA fragmentation rate (40%) and mitochondrial membrane potential and induction of cell death by apoptosis. Furthermore, CH-AgNPs blocked cells in G1 phase of the cell cycle and presented annexin-V dialing suggesting cell death by apoptosis. In short, it can be concluded that the green synthesis proved to be a good alternative for obtaining AgNPs with high cytotoxic potential. The association with chitosan may represent a promising potential for the treatment of CPMN.

Keywords: green synthesis, silver nanoparticles, *Curcuma longa*, nonmelanoma skin cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da carcinogênese	1
Figura 2: Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese	3
Figura 3: Camadas da pele com destaque para os diferentes tipos celulares.	4
Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência do câncer de pele não melanoma no Brasil.....	5
Figura 5: Evolução do carcinoma espinocelular ao longo do tempo.....	7
Figura 6: Exemplos de tipos de nanocarreadores.	12
Figura 7: Efeito EPR de macro- e nanopartículas através vasos sanguíneos fenestrados de tecido tumoral.....	15
Figura 8: Mecanismo de formação de nanopartículas metálicas por síntese verde.....	18
Figura 9: <i>Curcuma longa</i> L. Partes aéreas, tubérculo e tubérculo em pó	24
Figura 10: Estrutura química da curcumina.	26
Figura 11: Estrutura química da quitina e da quitosana.	27
Figura 12: Esquema do desenho experimental.....	36
Figura 13: Frasco reator utilizado na síntese verde de AgNPs	39
Figura 14: Representação das distribuições de partículas em número, volume e intensidade a partir de análise por Espalhamento de luz dinâmico (DLS).	42
Figura 15: Espectro de absorção de luz visível de AgNPs sintetizadas a partir de extrato aquoso (EA) de <i>C. longa</i> centrifugado ou filtrado em papel filtro	55
Figura 16: Espectro de absorção de luz visível de AgNPs sintetizadas a partir de extrato aquoso (EA) de <i>C. longa</i> fervido e filtrado em papel filtro.....	56
Figura 17: Espectro de absorção de luz visível das AgNPs à base de <i>C. longa</i> obtidas após 24 horas de síntese em diferentes temperaturas.	57
Figura 18: Espectro de absorção de luz visível das AgNPs obtidas após 24 horas de síntese a 75°C com diferentes concentrações de extrato aquoso (EA) de <i>C. longa</i>	59
Figura 19: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das AgNPs obtidas a partir de concentrações diferentes de EA de <i>C. longa</i>	60
Figura 20: Espectro de absorção de luz visível das AgNPs obtidas a partir de 0,25 mg/mL de EA de <i>C. longa</i> e variando a concentração de AgNO ₃	62

Figura 21: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das AgNPs obtidas a partir de 0,25 mg/mL de EA variando a concentração de AgNO ₃	63
Figura 22: Espectro de absorção de luz visível representando a FRP de AgNPs sintetizadas por 24 horas a 75°C a partir de pó de <i>C. longa</i> armazenado a -20°C ou a temperatura ambiente (T.A.).....	65
Figura 23: Espectro de absorção de luz visível representando a FRP de AgNPs sintetizadas por 24 horas a 75°C em tubo de ensaio (com presença de oxigênio) e em frasco reator (sem presença de oxigênio)	66
Figura 24: Cinética da síntese de AgNPs utilizando extrato aquoso filtrado de <i>C. longa</i> e AgNO ₃ a 75°C durante 48 horas.....	68
Figura 25: Espectro de absorção de luz visível representando a FRP de AgNPs sintetizadas a partir de EA de <i>C. longa</i> e AgNO ₃ por 24 horas a 75 °C e utilizadas para a formação de CH-AgNPs.	70
Figura 26: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, intensidade e volume das AgNPs e das CH-AgNPs.....	71
Figura 27: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, intensidade e volume de CH-TPP e CH-AgNO ₃	73
Figura 28: Imagem topográfica obtida por microscopia de força atômica (MFA) em modo fase das AgNPs e das CH-AgNPs.....	75
Figura 29: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das AgNPs e das CH-AgNPs	76
Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de CH-TPP e CH-AgNO ₃	77
Figura 31: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das AgNPs de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A	79
Figura 32: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i>) (nm) e índice de polidispersão (Pdl) das AgNPs de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A.....	81
Figura 33: Potencial Zeta (mV) das AgNPs de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A	82
Figura 34: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das CH-AgNPs de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A	83
Figura 35: Gráfico representando a distribuição de <i>Z-Average</i> (nm) e Pdl das CH-AgNPs de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A	84
Figura 36: Potencial Zeta (mV) das CH-AgNPs de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A.....	84
Figura 37: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das CH-TPP de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A	86

Figura 38: Gráfico representando a distribuição de <i>Z-Ave</i> (nm) e Pdl das CH-TPP de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A	87
Figura 39: O potencial Zeta (mV) das CH-TPP de acordo com o tempo de armazenamento a 4°C e T.A.....	87
Figura 40: Estabilidade das CH-AgNO ₃ ao longo de 30 dias armazenadas a 4°C.....	89
Figura 41: Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das AgNPs e dos controles extrato de <i>C. longa</i> e AgNO ₃	90
Figura 42: Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das CH-AgNPs e CH-TPP.....	91
Figura 43: Espectros obtidos por espectroscopia de massa MALDI-TOF das AgNPs à base de <i>C. longa</i> e dos controles extrato e AgNO ₃	93
Figura 44: Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de CE (A431) expostas a diferentes concentrações de AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP, CH-AgNO ₃ , AgNO ₃ , extrato e EA fresco por 24 horas.....	94
Figura 45: Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos (HaCAT) expostas a diferentes concentrações de AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP, CH-AgNO ₃ , AgNO ₃ , extrato e EA fresco, por 24 horas.	95
Figura 46: Porcentagem de células com e sem lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs e aos controles Paclitaxel (PTX), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e água ultra pura (H ₂ O).....	96
Figura 47: Número total de células após exposição por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs e os controles Paclitaxel (PTX), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e água ultra pura (H ₂ O).....	97
Figura 48: Imagens de microscopia de contraste de fase das células de CE (A431) após exposição ao controle H ₂ O, às AgNPs, CH-AgNPs e ao AgNO ₃ na concentração de 50 μM.....	98
Figura 49: Avaliação de parâmetros morfológicos da suspensão de células da linhagem de CE (A431) por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com AgNPs, AgNO ₃ e CH-AgNPs na concentração de 50 μM.....	100
Figura 50: Avaliação da fragmentação de DNA por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO ₃ e CH-TPP a 50 μM em linhagem de CE (A431).....	101
Figura 51: Avaliação do ciclo celular por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO ₃ e CH-TPP na concentração de 50 μM em linhagem de CE (A431)	102
Figura 52: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) avaliado por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição das células de CE (A431) às AgNPs, AgNO ₃ , CH-AgNPs e CH-TPP na concentração de 50 μM.....	103
Figura 53: <i>Dot plot</i> dos ajustes dos parâmetros para a detecção dos marcadores Anexina-V-FTIC e Iodeto de propídeo (PI) após o tratamento das células de CE (A431) com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	105

Figura 54: *Dot plot* da avaliação de morte celular das células de CE-A431 marcadas com Anexina-V e Iodeto de propídeo (PI) após tratamento com Paclitaxel (PTX) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 106

Figura 55: *Dot plot* da avaliação de morte celular de células CE-A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição ao controle com H₂O, AgNPs, CH-AgNPs e AgNO₃ na concentração de 50 µM 107

Figura 56: *Dot plot* da avaliação de morte celular de células CE-A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição ao controle com H₂O e CH-TPP na concentração de 50 µM..... 108

Figura 57: Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO₃ e CH-TPP na concentração de 50 µM..... 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Síntese verde de AgNPs e sua atividade antitumoral <i>in vitro</i>	16
Tabela 2: Exemplos de técnicas utilizadas na síntese de nanopartículas metálicas.	23
Tabela 3: Siglas de identificação dos grupos de tratamentos experimentais.....	47
Tabela 4: Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i> , nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas a partir de diferentes concentrações de EA de <i>C. longa</i>	61
Tabela 5: Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i> , nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO ₃ (0,25 – 0,5 e 1 mM)	64
Tabela 6: Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i> , nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas em tubos de ensaio (presença de oxigênio) e em frasco reator (sem presença de oxigênio).....	66
Tabela 7: Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i> , nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs secas por liofilizador e speed vácuo e ressuspendidas em água ultra pura.....	69
Tabela 8: Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i> , nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs e CH-AgNPs.	72
Tabela 9: Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z-average</i> , nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs e CH-AgNPs.	74
Tabela 10: Modo de vibração das amostras AgNPs e extrato analisadas por FTIR.....	93
Tabela 11: Compilação dos resultados dos ensaios biológicos em células de CE-A431 após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e AgNO ₃ a 50 µM	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU - 5-fluorouracil
A431 - Linhagem células de câncer de pele não melanoma humano
Ag⁺ - Íon prata
AgNO₃ – Nitrato de prata
AgNPs - Nanopartículas de prata
ATCC – *American Type Culture Collection*
AuNPs - Nanopartículas de ouro
CBC – Carcinoma basocelular
CE – Carcinoma espinocelular
CH-AgNO₃ – Nanopartículas de quitosana associada ao nitrato de prata
CH-AgNPs – Nanopartículas de prata associada à quitosana
CH-TPP – Nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio
C. longa – *Curcuma longa*
CP – Câncer de pele
CPM – Câncer de pele melanoma
CPNM – Câncer de pele não melanoma
DCNTs - Doenças crônicas não transmissíveis
DLS - *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dubecco)
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – *Desoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
EA - Extrato aquoso
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EV - Epidermodisplasia verruciformis
FDA - *Food and Drug Administration*
FTIR - *Fourier Transform Infrared* (infravermelho com transformada de Fourier)
HeLa – Linhagem de células de carcinoma cervical humano
HPV – Papilomavirus
HT 29 – Linhagem de células de adenocarcinoma humano
INCA - Instituto Nacional do Câncer
MFA - Microscopia de força atômica
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCI-H460 – Linhagem de células de câncer de pulmão não-pequenas humanas
NPs - Nanopartículas
NPMs - Nanopartículas metálicas
PdI - *Polydispersity Index* (Índice de polidispersividade)
PEG - Polietilenoglicol
pH - Atividade do íon hidroxônio
RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
Rpm - Rotações por minuto
TPP – Tripolifosfato de sódio
UnB - Universidade de Brasília
UV – radiação ultravioleta
XP - *Xeroderma pigmentosum*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER DE PELE (CP)	3
1.1.1 Carcinoma espinocelular (CE)	6
1.2 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA.	10
1.2.1 Nanopartículas metálicas (NPMs)	13
1.2.1.1 Aplicações em câncer.....	14
1.2.1.2 Abordagens para a síntese de NPMs	16
1.2.1.3 Nanopartículas de prata (AgNPs).....	17
1.2.2 Síntese verde	18
1.2.2.1 Uso de extratos vegetais para produção de NPMs.....	19
1.2.2.2 Planta de interesse para síntese verde de AgNPs: <i>Curcuma longa</i>	24
1.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NPMS - associação com polímeros	26
1.3.1 Quitosana	27
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) A PARTIR DO TUBÉRCULO DA <i>C. LONGA</i>	36
4.1.1 Preparação do extrato aquoso de <i>C. longa</i>	36
4.1.2 Síntese verde de AgNPs	37
4.1.2.1 Efeito da temperatura de síntese	38
4.1.2.2 Efeito da concentração do extrato aquoso e do nitrato de prata (AgNO ₃)	38
4.1.2.3 Efeito da temperatura de armazenamento do tubérculo em pó	39
4.1.2.4 Efeito da influência de gases atmosféricos.....	39
4.1.3 Cinética da síntese	40
4.1.4 Efeito da secagem da AgNPs	40
4.2 RECOBRIMENTO DAS AgNPs POR QUITOSANA PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA	40
4.3 ESTABILIDADE DAS AgNPs E DAS CH-AgNPs.....	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS.....	41
4.4.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	41
4.4.2 Microscopia de Força Atômica (MFA)	43
4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	43
4.4.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	

.....	44
4.4.5 Espectroscopia de massa (MALDI/TOF)	45
4.5 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS	45
4.5.1 Tripzinição das células	46
4.5.2 Plaqueamento das células	46
4.5.3 Tratamento	47
4.6 TESTES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS	48
4.6.1 Teste de viabilidade celular – ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol)	48
4.6.2 Avaliação da morfologia das células por microscopia invertida	49
4.6.3 Citometria de fluxo (FACS)	49
4.6.3.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular	50
4.6.3.2 Potencial de membrana mitocondrial	51
4.6.3.3 Exposição da fosfatidilserina	51
4.6.4 Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular	53
4.7 TESTES ESTATÍSTICOS	53
4.8 REFERÊNCIAS	53
5 RESULTADOS	54
5.1 SÍNTESE VERDE DE AgNPs	54
5.1.1 Otimização das condições da síntese de AgNPs	54
5.1.1.1 Efeitos da preparação do extrato aquoso (EA) da <i>Curcuma longa</i>	54
5.1.1.2 Efeitos da temperatura na formação de AgNPs.....	57
5.1.1.3 Efeitos da concentração do EA na síntese de AgNPs	57
5.1.1.4 Efeitos da concentração de nitrato de prata (AgNO ₃)	61
5.1.1.5 Efeitos da temperatura de armazenamento da <i>C. longa</i> na síntese de AgNPs	64
5.1.1.6 Efeitos da presença de ar atmosférico.....	65
5.1.2 Cinética da síntese de AgNPs	67
5.1.3 Associação das AgNPs à quitosana	69
5.1.4 Aspectos topográficos e morfométricos das AgNPs e das CH- AgNPs	74
5.2 ESTABILIDADE DAS NANOESTRUTURAS	78
5.2.1 AgNPs	79
5.2.2 CH-AgNPs	83
5.2.3 CH-TPPs	86
5.2.4 CH-AgNO₃	89
5.3 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADES MOLECULARES DAS ESTRUTURAS	91
5.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	91
5.3.2 Espectroscopia de massa MALDI/TOF	93

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS	94
5.4.1 Determinação da Viabilidade Celular – MTT	94
5.4.2 Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular	97
5.4.3 Avaliação da morfologia das células por microscopia com contraste de fase	99
5.4.4 Citometria de fluxo (FACS)	100
5.4.4.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular	102
5.4.4.2 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	104
5.4.4.3 Exposição de fosfatidilserina	106
6 DISCUSSÃO	113
7 CONCLUSÕES	133
8 PERSPECTIVAS	136
9 REFERÊNCIAS	137

1- INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) representam um grande problema de saúde pública e são responsáveis pela morte anual de 38 milhões de pessoas no mundo (Ministério da Saúde, 2011). As DCNTs incluem, por definição, doenças não infecciosas e não transmissíveis, geralmente de longa duração e de progressão lenta. Os quatro principais grupos de DCNTs são as doenças cardiovasculares, os cânceres, as doenças respiratórias e as diabetes e representam 74% das mortes no Brasil (Organização Mundial da Saúde, 2014). O câncer ocupa a segunda colocação entre as DCNTs de maior incidência, sendo responsável por aproximadamente 8,2 milhões de mortes por ano (Organização Mundial da Saúde, 2012).

Câncer é um termo utilizado para definir um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo e descontrolado (INCA, 2013). A formação do câncer (carcinogênese), na maioria das vezes, é de progressão lenta e requer múltiplas etapas (Figura 1).

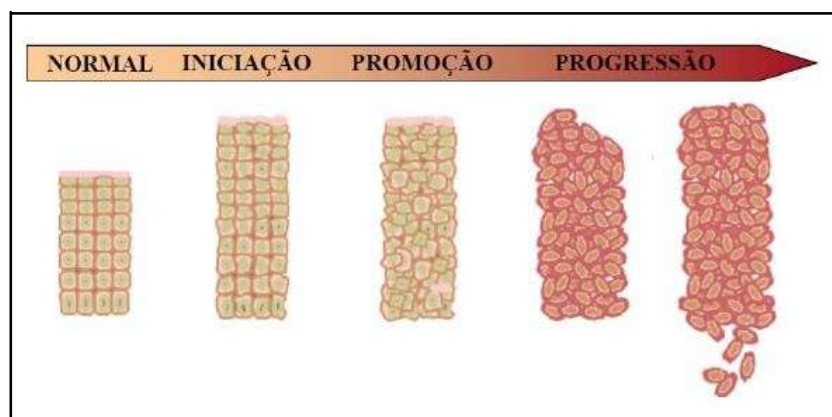


Figura 1: Etapas da carcinogênese. Fases de iniciação, promoção e progressão. Adaptado de http://hs.riverdale.k12.or.us/~dthompo/exhib_03/emilty03/cancer22.gif, acessado em novembro de 2015.

O primeiro estágio da carcinogênese é a iniciação do tumor. Durante esta fase, as células sofrem modificações genéticas irreversíveis após exposição aos agentes

carcinógenos químicos, físicos e/ou biológicos (Hanahan e Weinberg, 2011). As células modificadas podem permanecer em latência por anos e permanecem nesta fase de iniciação devido ao controle da proliferação celular (Oliveira et al, 2007). Além disso, podem permanecer com um fenótipo e uma função semelhantes aos das células normais e o tecido é denominado de hiperplásico (Hanahan e Weinberg, 2011).

O segundo estágio da carcinogênese é a promoção tumoral onde o tecido hiperplásico passa a ser chamado de tecido displásico (Hanahan e Weinberg, 2011). A fase é reversível e está associada à exposição prolongada de agente carcinógeno que resulta em um aumento anormal da proliferação celular e de alterações na expressão gênica (Oliveira et al, 2007). Dessa forma, o DNA modificado é transferido para as células filhas e o tumor se expande. As células alteram sua morfologia e função de origem mas ainda é considerado como benigno (Hanahan e Weinberg, 2011).

A última etapa da carcinogênese é a de progressão. As células modificadas se multiplicam de forma descontrolada e adquirem a capacidade de invadir outros tecidos por vias linfáticas e a partir da angiogênese, o processo de formação de novos vasos sanguíneos. Dessa forma, as células tumorais podem entrar em metástase, se espalham nos tecidos próximos ou distantes do sítio inicial e formam o câncer maligno propriamente dito (Oliveira et al, 2007).

Ao longo da carcinogênese, o tecido tumoral passa a adquirir várias características, como as ilustradas na figura 2. Uma desregulação na resposta dos sinais supressores à divisão celular leva as células a adquirir a característica fundamental de célula tumoral, a proliferação descontrolada. Dessa forma, as células se replicam infinitamente e se tornam resistentes aos sinais de morte celular. Além disso, a angiogênese possibilita que as células cancerígenas recebam os nutrientes e o oxigênio necessários para o

crescimento, assim como propicia a sua invasão em outros tecidos e, conseqüentemente, o processo de metástase (Hanahan e Weinberg, 2011).

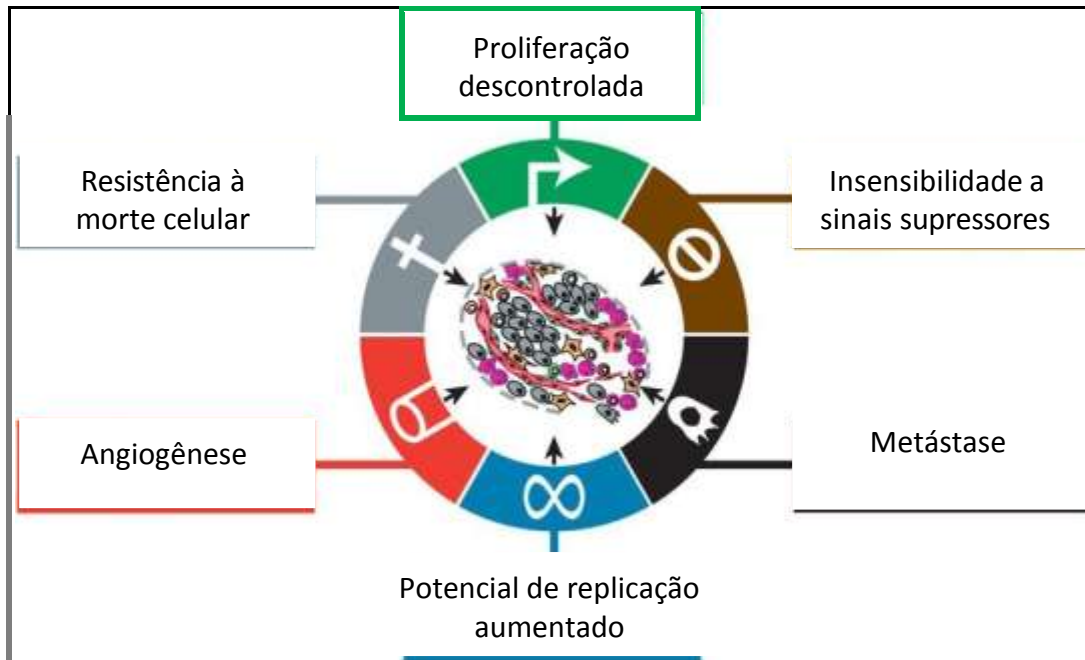


Figura 2: Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

1.1 CÂNCER DE PELE (CP)

A pele é o maior órgão do corpo e representa aproximadamente 16% da massa corporal de um indivíduo (Simões et al, 2014). O seu principal papel consiste em atuar como barreira física e biológica contra agressões externas de natureza química, física (radiação) e/ou biológica (microrganismos) (D’Orazio et al, 2013). A pele pode ser dividida em epiderme (camada mais superficial) e derme (camada mais interna) sendo constituída por vários tipos celulares (Figura 3). Na epiderme, os queratinócitos e os melanócitos são os principais tipos celulares. Os queratinócitos representam o grupo mais abundantes de células da pele e são responsáveis pela produção de queratina, proteína fibrosa que compõe a camada protetora desse tecido. Essas células podem

ser chamadas de células escamosas e são formadas por diferenciação das células basais. Em paralelo, os melanócitos são menos abundantes e são responsáveis pela secreção de melanina. Na derme, células do sistema imune e fibroblastos representam os principais tipos celulares encontrados (Lacy e Alwan, 2013).

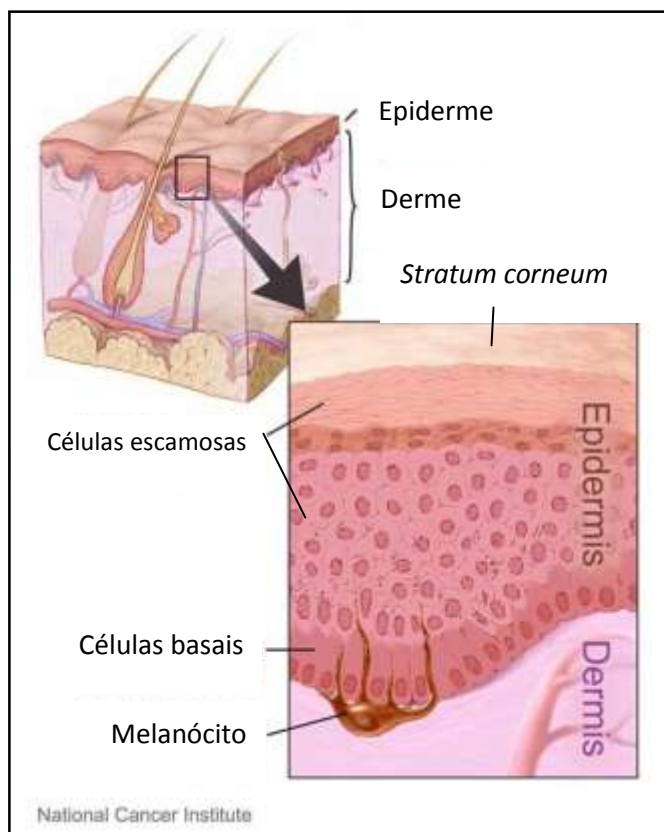


Figura 3: Camadas da pele com destaque para os diferentes tipos celulares: melanócitos e queratinócitos (células escamosas e basais). Adaptado de *National Cancer Institute* (EUA) (<http://www.cancer.gov/publications/patient-education/skin.pdf>), acessado em novembro de 2015.

O CP apresenta a maior taxa de incidência dentre todos os tipos de cânceres com mais de 25% dos casos (Lacy e Alwan, 2013, INCA, 2015). É possível que o número de casos seja ainda mais expressivo uma vez que há equívocos no diagnóstico e falta de registro de tal condição patológica em algumas partes do mundo (Simões et al, 2014).

Todos os cânceres de pele iniciam-se na epiderme e são diferenciados de acordo com o tipo celular relacionado ao desenvolvimento do tumor (INCA, 2015). O CP

melanoma (CPM) tem origem nos melanócitos sendo considerado o tipo de CP mais agressivo por desencadear metástases. Entretanto, o CPM apresenta uma baixa incidência e representa apenas 3% das neoplasias da pele (INCA, 2014).

O segundo tipo de CP é o não melanoma (CPNM), o qual está relacionado ao desenvolvimento de tumores nos queratinócitos da epiderme (Lacy e Alwan, 2013). Apesar dos baixos índices de mortalidade, o CPNM apresenta uma expressiva incidência dentre os CP com 97% dos casos. O Instituto Nacional de Câncer brasileiro (INCA) estimou pelo menos 175.760 novos casos a serem diagnosticados no Brasil em 2016 (INCA, 2015), sendo que as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste seriam as mais atingidas (Figura 4). Os homens têm maior tendência a desenvolver esse tipo de câncer, assim como pessoas de pele clara, sensíveis aos raios solares e/ou que apresentam outras doenças cutâneas e predisposições genéticas (INCA, 2014).

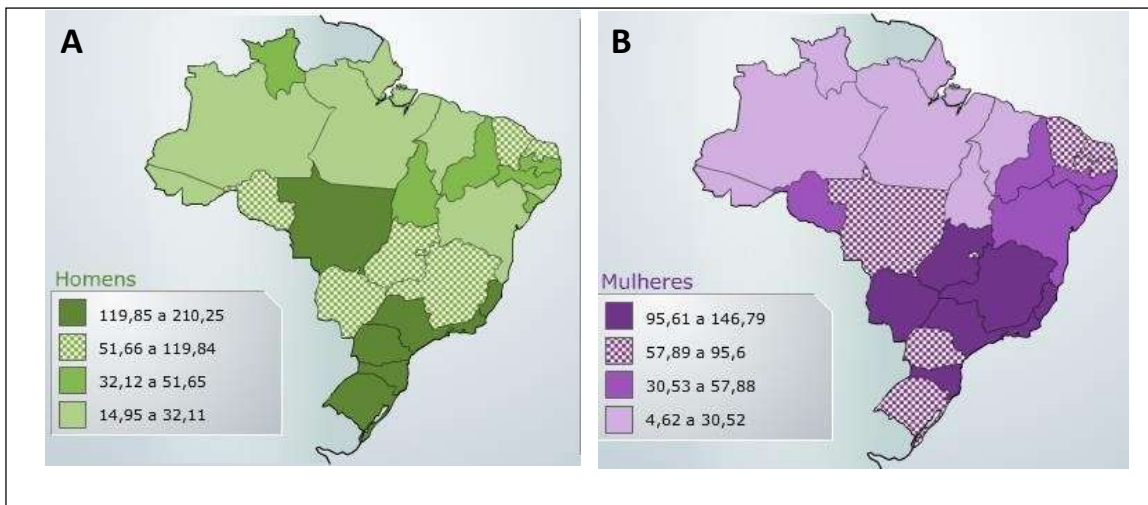


Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência do câncer de pele não melanoma no Brasil por 100 mil homens (A) e 100 mil mulheres (B), estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação. (Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=1>, acessado em novembro de 2015).

O CPNM está dividido em vários subtipos, sendo que os dois principais são: o carcinoma basocelular (CBC), de menor agressividade, porém de maior incidência, com

70% dos CPNM; e o carcinoma epidermoide ou espinocelular (CE), considerado o subtipo mais agressivo representando 25% dos casos (INCA, 2013).

1.1.1 Carcinoma epidermoide ou espinocelular (CE)

O CE é um tumor maligno que apresenta um relevante potencial para desencadear metástases (Lacy e Alwan, 2013) sendo responsável por 70% das mortes por CPNMs (Zink, 2014). Este tumor origina-se em células escamosas presentes nas camadas mais superficiais da epiderme (Figura 3). Neste caso, esse tipo de tumor pode ser consequência de lesões precursoras pré-malignas como a queratose actínica, a doença de Bowen e a queratoacantoma (Lacy e Alwan, 2013; Madan et al, 2010) ou não-malignas como cicatrizes (Kallini et al, 2014). A sua evolução pode ser detectada visualmente com o surgimento e as transformações físicas de manchas suspeitas de acordo com a evolução da sua simetria, da regularidade de borda, da cor e da dimensão (Figura 5). As principais metástases do CE são encontradas nos pulmões, no colo de útero e na mucosa oral (Lacy e Alwan, 2013).

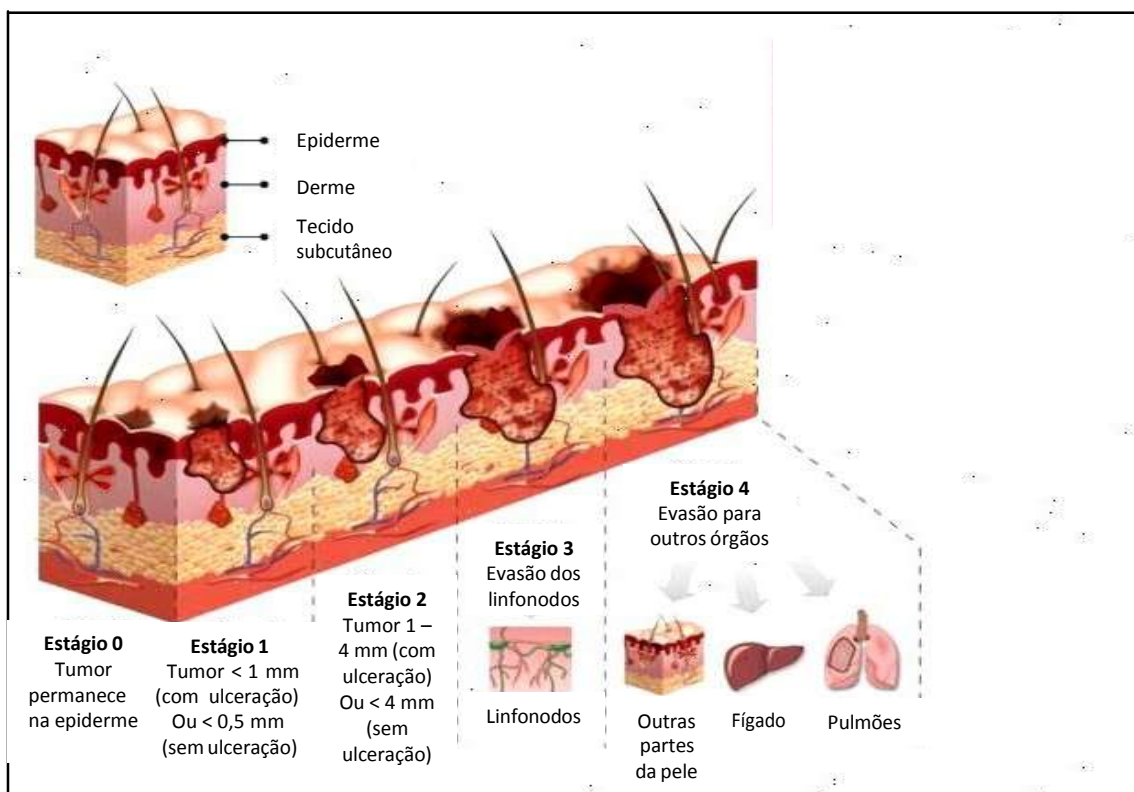


Figura 5: Evolução do carcinoma espinocelular ao longo do tempo. (Adaptado de <http://ec.bledar.com/cancer-de-pele>, acessado em novembro de 2015).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do CE. O albinismo, doença congênita que afeta os melanócitos, e o Xeroderma pigmentoso (XP), doença autossômica recessiva na qual o sistema de reparo do DNA da pele é fortemente reduzido, podem levar ao desenvolvimento precoce de CE. O risco do surgimento de um CE antes dos 20 anos de idade é 1000 vezes maior para os indivíduos com XP (Kallini et al, 2014). Alguns estudos realizados principalmente na população australiana relataram que 70% dos pacientes que receberam transplante de rim há 20 anos desenvolveram o CE. Este fato foi associado à presença de antígeno de leucócito humano e ao polimorfismo da glutatona-S transferase que estimulariam o surgimento de CE após o transplante (Kallini et al, 2014). Em 2013, a “6ª Conferência Internacional sobre o Papilomavirus (HPV), Poliomavirus e Radiação UV em câncer de

pele” relatou a estreita ligação entre a presença de HPV cutâneos e o risco de desenvolver o CE, principalmente em pacientes imunodeprimidos (Ninld et al, 2013). Este fato foi primeiramente descoberto em pacientes com epidermodisplasia verruciformis (EV) que desenvolvem com frequência o CE. Os HPV cutâneos infectam os queratinócitos e por isso podem agir como co-carcinógeno com as radiações ultravioletas (UV) (Accardi e Gheit, 2014).

Entretanto, o principal fator de risco é ainda atribuído à exposição crônica e prolongada às radiações UVA e UVB (Lacy e Alwan, 2013; Kallini et al, 2014). Dessa forma, o CE aparece preferencialmente em regiões fotoexpostas como a cabeça, o rosto e o pescoço (55%), as mãos e os braços (18%), as pernas (13%) entre outros (Zink, 2014; Kallini et al, 2014).

O diagnóstico do CE é realizado a partir de biópsia e de análises histopatológicas (Kallini et al, 2014). De acordo com a sua origem (radiação UVA ou UVB, lesões pré-malignas, entre outras), o CE pode apresentar características morfológicas e fisiológicas específicas que vão auxiliar na escolha do tratamento. Como a maioria dos cânceres, o diagnóstico precoce do CE permite uma maior chance de cura.

A escolha do tratamento depende do tipo e da localização do câncer, da idade e do estado físico do paciente e dos riscos de recorrência do tumor (Vyas et al., 2012). O tratamento frequentemente utilizado é o método cirúrgico por excisão do tumor ou por cirurgia micrográfica de Mohs que levam à cura do paciente em 95 e 97% dos casos, respectivamente (Parikh et al, 2014). No entanto, vários riscos estão associados a esses procedimentos como o potencial de desfigurar o paciente, caso a lesão encontre-se no rosto; a possível perda funcional e/ou presença de remanescentes de

células tumorais na região operada (Neville et al, 2007; Parikh et al 2014). Dessa forma, os tratamentos não cirúrgicos estão sendo cada vez mais utilizados (Lacy e Alwan, 2013).

A terapia fotodinâmica é uma técnica baseada no uso de agente fotossensibilizante ativado pela luz para a destruição seletiva de um tecido. A sua eficácia varia de 75 a 97%. A principal desvantagem dessa técnica é o desconforto, a dor e a sensação de queimação relatados pelos pacientes durante o tratamento (Bahner e Bordeaux, 2013). A crioterapia é uma outra técnica empregada no tratamento de CE. Este método de destruição tecidual é simples, econômico e baseado na aplicação tópica de nitrogênio líquido. A sua eficácia oscila de 94 a 99%, contudo, várias reações adversas foram relatadas como a formação de bolhas, eritema, edema e hipopigmentação no local da aplicação (Bahner e Bordeaux, 2013). Outro método não cirúrgico para o tratamento de CE é a quimioterapia tópica. O 5-fluorouracil (5-FU) e o imiquimode são frequentemente empregados como agentes tópicos (Bahner e Bordeaux, 2013; Madan et al, 2010; Neville et al, 2007). O 5-FU é um análogo à pirimidina e age diretamente no DNA e/ou RNA induzindo a parada do ciclo celular e a morte celular por apoptose (Bahner e Bordeaux, 2013). Em paralelo, a imiquimode é um fármaco que estimula a resposta do sistema imune inato e induz a formação e liberação de citocinas e interferon pelas células T (Bahner e Bordeaux, 2013). Em estudos realizados em humanos com CE, esses agentes demonstraram uma eficácia de 56 - 75% e 71%, respectivamente. Contudo, ambos os tratamentos resultaram em vários efeitos adversos localizados tais como eritema, sensação de queimação, dermatite e fotossensibilidade. Além disso, o imiquimode resultou também em efeitos

adversos sistêmicos como dor de cabeça, tontura e, raramente, distúrbios urinários (Bahner e Bordeaux, 2013).

Diante deste cenário, o desenvolvimento de tratamentos e terapias inovadoras tem resultado na investigação de novos medicamentos e métodos de aplicação. A administração tópica é a mais empregada para o tratamento do CE. Entretanto, a entrega de medicamentos pode ser realizada por outras vias como a administração intravenosa, a intramuscular, a subcutânea, a intratumoral e a oral (Simões et al, 2014). Adicionalmente, os avanços realizados na área destacam a aplicação da nanotecnologia como uma possível alternativa para o controle do CPNM contribuindo para uma melhor eficiência dos tratamentos e redução de efeitos colaterais, conforme relatado a seguir (Simões et al, 2014).

1.2 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

A nanociência surgiu na segunda metade do século XX e se tornou uma área importante para a progressão da ciência, com investimentos mundiais estimados em aproximadamente 1 a 2 trilhões de dólares para 2015 (Schaefer, 2010). O prefixo “nano” vem do grego “*nanos*” que significa “anão”. Dessa forma, a nanociência é a ciência que estuda a matéria em uma escala de tamanho de 1 a 100 nm (Bai e Liu, 2013). Em 1959, o físico Richard Feynman enfatizou a ideia da escala nanométrica com a palestra “*There is plenty of room at the bottom*” apresentada durante o encontro da Sociedade Americana de Física. Nos anos 80, essa ideia foi realizada com a invenção da microscopia de tunelamento permitindo o início da investigação e desenvolvimento de nanoestruturas. Ao diminuir o tamanho da matéria, a razão superfície/volume aumenta e novas propriedades físicoquímicas surgem, tornando as nanoestruturas

únicas (Bai e Liu, 2013). Apesar de ser uma ciência relativamente nova, foram observados relatos de época que mostram alguns fatores relacionados à diminuição do tamanho da matéria. Pode-se destacar o físico e químico inglês Michael Faraday que observou a mudança de coloração de uma solução de ouro associada à variação de tamanho das partículas (Faraday, 1857).

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar da nanociência que estuda a utilização e o desenvolvimento de sistemas em escala nanométrica (Ferrari, 2005). O engenheiro e nanotecnólogo Eric Drexler foi o primeiro a popularizar o termo e o conceito de nanotecnologia com a sua ideia visionária e ficcional de reproduzir mecanicamente a biologia celular (Drexler, 1981).

Na área da saúde humana, um dos objetivos da nanotecnologia é a formulação de nanossistemas biocompatíveis capazes de transportar e liberar medicamentos de interesse até o alvo (Parveen et al, 2012). Nos anos 2000, o Instituto Nacional de Saúde nos Estados Unidos utilizou o termo de “nanomedicina” para se referir à aplicação da nanotecnologia para o diagnóstico, tratamento e controle de sistemas biológicos (Moghimi et al, 2005). O uso da nanomedicina no diagnóstico e no tratamento do câncer evidenciou várias vantagens devido às propriedades físicoquímicas dos nanomateriais. O tamanho permite uma melhor penetração e retenção de medicamentos nas células tumorais. As propriedades químicas e a razão superfície/volume aumentam a eficácia de ligação de medicamentos ao nanossistema e melhoram a sua entrega e retenção na célula neoplásica. Além disso, a possibilidade de funcionalizar os nanocarreadores aumenta a especificidade do tratamento (Kai et al, 2013). Dessa forma, o uso da nanomedicina pode ser realizado em combinação com

os tratamentos convencionais com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais adversos e melhorar a eficácia e a especificidade do medicamento antitumoral.

Os nanomateriais sintetizados podem apresentar características diferentes de acordo com o tipo de aplicação desejado. Alguns exemplos de nanomateriais são representados na figura 6.

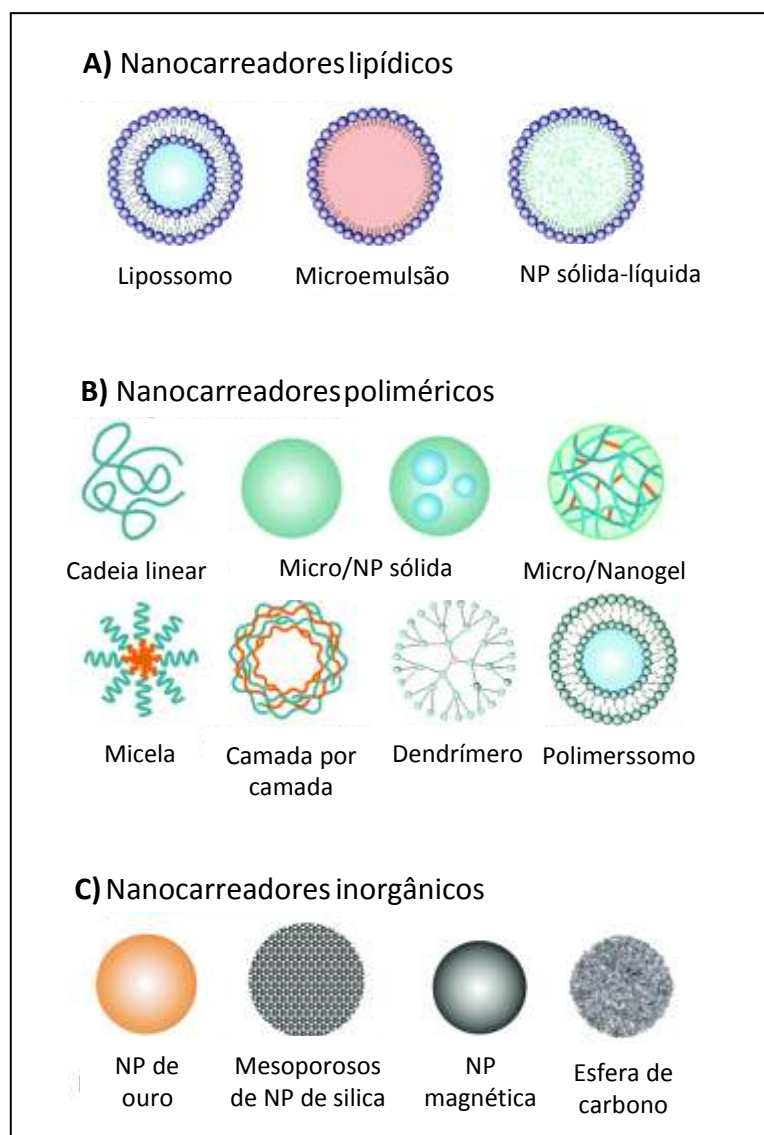


Figura 6: Exemplos de tipos de nanocarreadores. Adaptado de: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/cs/c3cs60436e#!divAbstract>, acessado em novembro de 2015.

Dentre esses nanocarreadores, podem ser destacadas as nanopartículas metálicas, as nanopartículas poliméricas, as nanopartículas magnéticas, os lipossomos,

as nanoemulsões, os nanotubos de carbono, entre outros (Simões et al, 2014). Misak e colaboradores (2013) mostraram que o 5-fluorouracil nanoencapsulado apresentou uma melhor eficácia em comparação com o composto livre no tratamento *in vivo* do CE. Além disso, a sua eficiência foi mantida por mais tempo e em concentração menor (Misak et al, 2013). Portanto, o uso de nanocarreadores para o tratamento do CP é de grande relevância e apresenta várias vantagens: uma administração do medicamento em dose menor; um aumento da meia vida do medicamento no organismo; um aumento na dispersão de medicamentos hidrofóbicos; uma melhor biodistribuição e consequentemente uma diminuição dos efeitos adversos (Dianzani et al, 2014). Além disso, o uso da nanotecnologia pode permitir uma maior permeação e distribuição do medicamento nas diferentes camadas da pele devido às características físicoquímicas do nanomaterial (tamanho, forma, composição química, entre outros) (Korinth e Drexler, 2013).

1.2.1 Nanopartículas metálicas (NPMs)

As nanopartículas metálicas possuem por definição um tamanho inferior a 100 nm e apresentam propriedades físicas, químicas, fotoeletroquímicas, mecânicas, eletrônicas, magnéticas, ópticas e biológicas únicas (Sadighi, 2013). Essas propriedades conferem às NPMs várias opções de aplicação na medicina (diagnóstico e tratamento), na farmácia (sistemas de entrega de medicamentos), na área cosmética (protetores solares), na indústria alimentícia e têxtil (embalagens e tecidos com propriedades antimicrobianas), na engenharia (painéis solares), entre outros (Kholoud et al, 2010; Ingale, 2013).

1.2.1.1 Aplicações de nanopartículas metálicas no câncer

As NPMs são agentes versáteis devido às suas propriedades únicas. Portanto, a sua aplicação no câncer pode ser realizada de várias formas. As nanopartículas de prata (AgNPs) e de ouro (AuNPs) são frequentemente empregadas no diagnóstico do câncer por imagem devido às suas propriedades ópticas. Além disso, as NPMs podem ser utilizadas no tratamento do câncer como sistemas de liberação de medicamentos, inibidores da angiogênese ou inibidores do crescimento tumoral entre outros (Ong et al, 2013). A aplicação de AgNPs em células de carcinoma de pulmão humano (A549) mostrou que essas partículas podem também induzir o estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Suliman et al, 2013). Em 2008, Arora e colaboradores evidenciaram que AgNPs mantêm um potencial anticancerígeno e bloqueiam a proliferação celular em CPNM (linhagem de CE - A431) após 24 horas de exposição. AshaRani e colaboradores (2009) demonstraram a citotoxicidade e genotoxicidade de AgNPs em linhagem de glioblastoma U251, onde as partículas foram capazes de induzir a parada do ciclo celular, danos ao DNA e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (AshRani et al, 2009). Adicionalmente, alguns estudos buscam desenvolver NPMs funcionais para o diagnóstico e o tratamento simultâneo do câncer, denominados de “teranóstico” (Sharma et al, 2015; Conde et al, 2012; Ong et al, 2013).

Algumas características das células cancerígenas auxiliam na especificidade e na eficácia das NPMs no diagnóstico e/ou no tratamento do câncer. Em geral, tumores são caracterizados por apresentarem um sistema de drenagem linfática reduzido e uma vascularização abundante com fenestras variando entre 300 a 700 nm (Lembo e Cavalli, 2010). Dessa forma, as NPMs podem atravessar essas fenestras de forma

passiva, possibilitando assim uma melhor permeação, retenção e acumulação no tumor. Esse efeito é conhecido como EPR (*enhanced permeation and retention*) (Figura 7). Adicionalmente, a funcionalização da superfície das NPMs com peptídeos, anticorpos, moléculas de DNA ou RNA, entre outros, permite uma penetração ativa das mesmas no tumor por meio de interações específicas com receptores presentes em células tumorais (Conde et al, 2012).

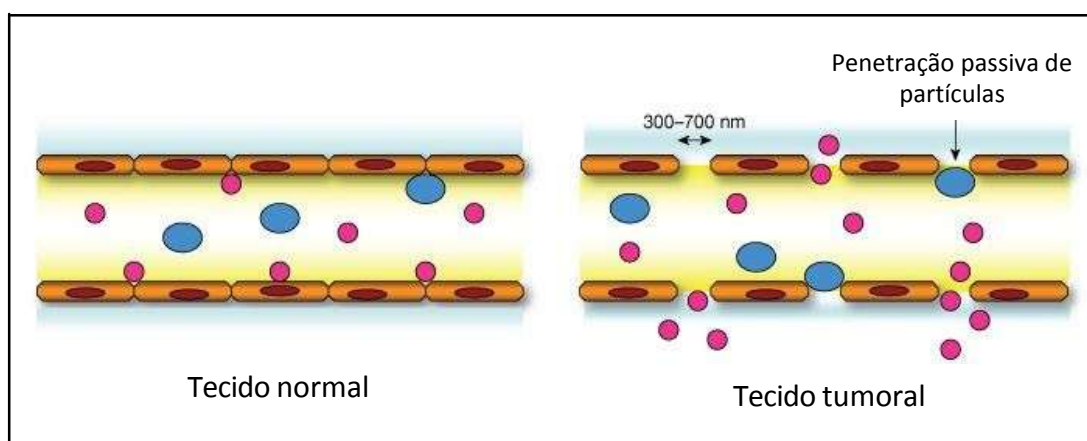


Figura 7: Efeito EPR (retenção e permeação aumentadas) de macro- e nanopartículas através de vasos sanguíneos fenestrados do tecido tumoral (Adaptado de Lembo e Cavalli, 2010).

De acordo com Arvizo e colaboradores (2013), as particularidades das NPMs possuem um papel importante para que a sua entrega no tumor seja realizada com eficácia. O tamanho menor e um formato esférico favorecem a penetração passiva no tumor. Além disso, outra característica importante é a carga superficial das NPMs onde as catiônicas são favorecidas para atravessar a membrana plasmática através de interações eletrostáticas, uma vez que a superfície externa da membrana é aniônica. Entretanto, alguns estudos demonstraram a presença de NPMs aniônicas no citosol, sugerindo um transporte passivo por meio dos domínios lipofílicos da membrana celular (Arvizo et al, 2013).

1.2.1.2 Abordagens para a síntese de NPMs

As NPMs podem ser sintetizadas via métodos químicos, físicos e biológicos. Existem duas abordagens para a síntese: o *Top-down* (métodos físicos) e o *Bottom-up* (métodos químicos e biológicos) (Tabela 1). Na abordagem *Top-down*, o material de partida macroscópico é reduzido em tamanho nanométrico utilizando meios mecânicos ou fisicoquímicos. A presença de impurezas durante o processo de síntese pode comprometer as propriedades fisicoquímicas das estruturas obtidas. Adicionalmente, esta abordagem gasta muita energia e a produção de nanoestruturas é pouco eficiente. Outra desvantagem é a imperfeição da superfície das estruturas. Tais problemas podem ter um impacto significativo nas propriedades físicas e químicas de superfície dos nanomateriais (Mittal et al, 2013).

Em paralelo, o *Bottom-up* (automontagem) refere-se à construção de uma estrutura na escala nanométrica átomo por átomo, molécula por molécula, ou *cluster* por *cluster*. Neste caso, apresenta um custo de produção baixo, maior rapidez, e os nanomateriais possuem características fisicoquímicas mais homogêneas (Mittal et al, 2013).

Tabela 1: Exemplos de técnicas utilizadas na síntese de nanopartículas metálicas (Mittal et al, 2013).

Abordagem <i>Top-down</i>	Abordagem <i>Bottom-up</i>
Ablação a laser/térmica	Redução química
Nanolitografia	Deposição em vapor
Cauterização química	Processo sol-gel
Evaporação-condensação	Pirólise por spray ou laser

Os metais e óxidos metálicos frequentemente utilizados na síntese de NPMs são a prata (Ag), o ouro (Au), o ferro (Fe), o paládio (Pd), o cobre (Cu), o platino (Pt), o óxido de titânio

(TiO₂), o óxido de zinco (ZnO), o óxido de cobre (CuO) e o sulfeto de chumbo (PbS) entre outros (Kharissova et al, 2013).

1.2.1.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)

Um dos metais frequentemente utilizados na síntese de NPMs é a prata (Mittal et al, 2013). Os nanomateriais a base de prata representam cerca de 30 % dos produtos nanotecnológicos comercializados (Reidy et al, 2013). Dessa forma, foram realizados vários estudos relacionados à investigação dos mecanismos de ação das AgNPs sendo relatados que a toxicidade destas nanopartículas está associada à liberação lenta dos íons Ag⁺. Neste caso, esta liberação sustentada permite prolongar o seu efeito tóxico sem necessidade de aumentar a dose (Yu et al, 2013). Devido às propriedades específicas das células cancerígenas como a presença de fenestras de 300 a 700nm nos vasos sanguíneos, as AgNPs se acumulam preferencialmente no tecido tumoral. Portanto, a ação antitumoral é otimizada e melhor direcionada ao tecido alvo, resultando em efeitos colaterais adversos reduzidos.

A síntese tradicional de AgNPs é realizada por métodos físicos ou químicos e alguns exemplos estão ilustrados na tabela 1. Entretanto, esses métodos envolvem o uso de condições físicas extremas, como alta temperatura ou alta pressão, e o uso de solventes químicos que podem resultar na geração de resíduos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (Tran et al, 2013). Portanto, o desenvolvimento de métodos de síntese mais seguros se tornou necessário. Dentre as alternativas mais promissoras, destaca-se a síntese biológica ou síntese verde.

1.2.2 Síntese verde

A síntese biológica, também conhecida como “síntese verde”, consiste em formular nanossistemas metálicos a partir da redução de um metal utilizando-se organismos biológicos (plantas, bactérias, fungos, algas entre outros) ou parte deles, bem como biomoléculas ou metabólitos isolados (Iravani, 2011; Jeyaraj et al, 2013; Silva et al, 2015) (Figura 8). Esse tipo de síntese apresenta diversas vantagens tais como uma maior biocompatibilidade dos nanossistemas e um menor custo de produção. Além disso, os processos de síntese verde são livres do uso de reagentes químicos e da formação de resíduos tóxicos (Kharissova et al, 2013).

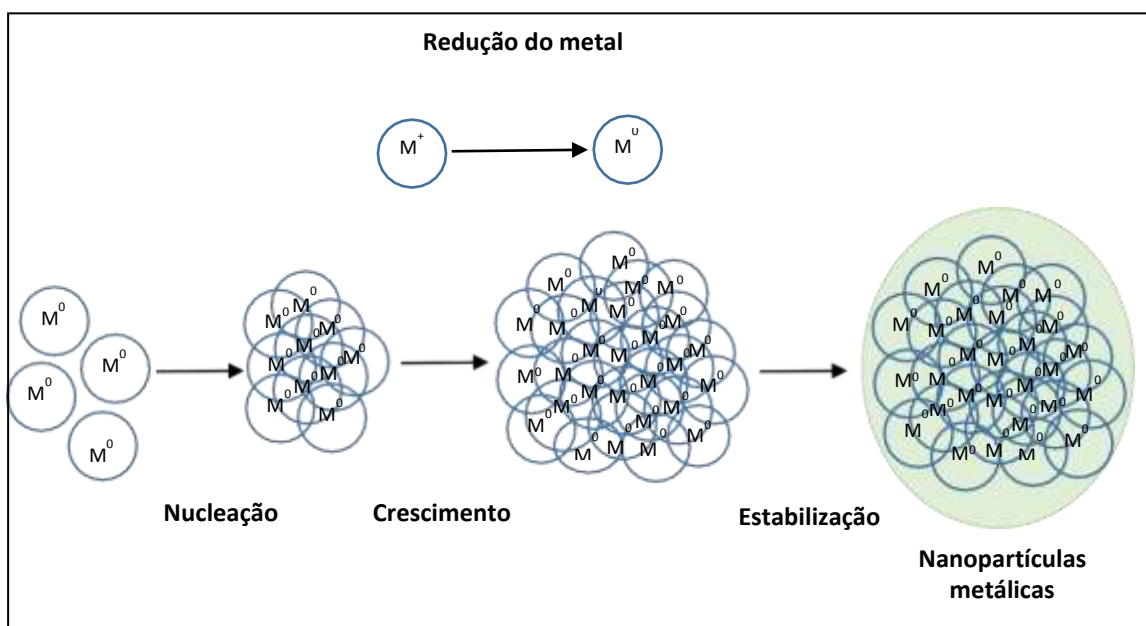


Figura 8: Mecanismo de formação de nanopartículas metálicas por síntese verde. A primeira etapa é a redução dos sais metálicos por biomoléculas ou metabólitos, formando átomos neutros. A segunda parte refere-se a nucleação onde os átomos colidem e formam um núcleo estável. A terceira fase é a de crescimento na qual mais átomos colidem e formam partículas maiores. Por fim, a estabilização ocorre pelo esgotamento dos íons metálicos na solução ou pelo recobrimento da partícula por compostos presentes em extratos material biológico impedindo a aglomeração. (Adaptado de Albernaz, 2014).

Os microrganismos tais como bactérias, vírus, fungos, actinomicetos e leveduras possuem a capacidade natural de reduzir metais formando assim nanopartículas intracelulares ou extracelulares. Entretanto, devido à complexidade de uso desses

organismos (cultivo e manutenção das culturas em laboratório), e à dificuldade de purificar e separar as NPMs posteriormente (para as sínteses intracelulares), materiais derivados de plantas têm sido preferencialmente utilizados no processo de síntese verde (Akhtar et al, 2013).

1.2.2.1 Uso de extratos vegetais para produção de NPMs

O grupo do laboratório de Nanotecnologia (LNANO) da Embrapa liderado pelo Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva apresenta uma linha de pesquisa na área de síntese verde de AgNPs a partir de extratos vegetais. O grupo investiga o potencial de síntese de várias plantas do bioma Cerrado tais como *Anacardium occidentale* L (castanha), *Brosimum gaudichaudii* (folha), *Hancornia speciosa* (casca, polpa, semente e folha) entre várias outras. Além de demonstrar grande experiência na parte de síntese e caracterização, o grupo procura aplicar essas AgNPs em diversas áreas como na biomedicina (antitumoral, antifúngico, antibacteriano), no diagnóstico (nanobiossensores) e/ou na agricultura (anti-nematoide). Portanto, o grupo participa ativamente no entendimento e na superação dos desafios dessa nova área (Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014; Da Silva, 2014, Silva et al, 2015).

O reino vegetal reúne dois grupos de plantas: as avasculares, como algas, briófitas e pteridófitas; e as vasculares, como gimnospermas e angiospermas. A seleção da planta a ser utilizada para a síntese de NPMs pelo método de síntese verde pode ser baseada em alguns critérios. Uma planta que apresenta uma distribuição geográfica mundial possui um maior interesse, pois possibilita uma maior acessibilidade a seus extratos. Por isso, de acordo com a literatura, as angiospermas são o grupo de maior interesse para o uso na síntese verde (Das e Brar, 2013). Além

disso, é importante conhecer as possíveis propriedades medicinais da planta (antimicrobiana, antitumoral, antidiabética, entre outros) para determinar os objetivos do estudo.

O perfil fitoquímico de uma planta fornece informações cruciais para determinar o seu poder redutor (Das e Brar, 2013). As biomoléculas e os metabólitos presentes nos extratos de plantas servem como agentes redutores de metal assim como agentes estabilizadores da síntese (Mittal et al, 2013). Dentre essas moléculas destacam-se aminoácidos, flavonoides, grupos funcionais (álcool, aldeído, aminas), NADP redutase, peptídeos, fenóis, polifenóis, polissacarídeos, saponinas, terpenoides entre outros (Akhtar et al, 2013). Dessa forma, as NPMs formuladas a partir de extratos de plantas podem ser estáveis, de síntese rápida e produzidas em larga escala (Iravani, 2011; Mittal et al, 2013).

As folhas são preferencialmente utilizadas na síntese de NPMs (Akhar et al, 2013; Albernaz, 2014), entretanto, as outras partes da planta como raízes e tubérculos (Rathi Ser et al, 2015; Shameli et al, 2014), látex (Thakore et al, 2015), caule (Paulkumar et al, 2014), flores (Nayak et al, 2015), frutas (Chowdhury et al, 2015; Da Silva, 2014; Bonatto e Silva, 2014), casca (Ibrahim et al, 2015; Da Silva, 2014) e sementes (Ismail et al, 2014; Da Silva, 2014) também apresentam moléculas de grande potencial para a biossíntese e vêm sendo cada vez mais investigadas.

Cada parte de uma planta apresenta moléculas distintas que podem afetar as características das NPMs tais como o tamanho, a distribuição de tamanho, a forma e o rendimento da síntese (Kumar et al, 2010). Abbasi e colaboradores (2014) observaram a diferença de tamanho e forma de nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizadas a partir de extratos aquosos de caule, raiz ou folha da planta *Ipomoea carnea*. Foram

observadas estruturas anisotrópicas (triangulares e hexagonais) de 25 a 100 nm e de 10 a 40 nm, respectivamente, e de estruturas esféricas de 3 a 40 nm.

Apesar das diferenças fisicoquímicas, as NPMs obtidas a partir de extratos distintos de uma mesma planta podem apresentar um potencial similar em uma atividade biológica específica. Paulkumar e colaboradores (2014) investigaram o uso de extrato de folha ou de caule de *Piper nigrum* para a síntese de AgNPs. As análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram estruturas em filamento de 7 a 50 nm e 9 a 30 nm, respectivamente. As duas estruturas apresentaram um grande potencial para controlar as fitobactérias *Citrobacter freundii* e *Erwinia cacticida* após 24 horas de exposição na mesma concentração.

Plantas coletadas em locais e períodos diferentes podem apresentar perfis fitoquímicos distintos o que pode influenciar nas características da síntese de NPMs. Albernaz (2014) observou que folhas de *Brosimum gaudichaudii* coletadas no verão (período úmido do Cerrado) possuem um maior potencial para formar AgNPs em comparação com as folhas coletadas no inverno (período seco do Cerrado). Dessa forma, a reprodutibilidade da síntese verde de NPMs é um grande desafio devido às ações do estresse abióticos e bióticos bem como as condições edáficas, localização entre outros.

A síntese verde de nanopartículas utiliza, preferencialmente, a prata, mas outros metais e óxidos de metais também podem ser explorados. As características das NPMs podem variar de acordo com a escolha do metal. O extrato aquoso de raiz de *Plumbago zeylanica* foi utilizado para a síntese de AgNPs, AuNPs e Ag/AuNPs onde foram obtidas estruturas esféricas de 60 nm, triangulares de 20 a 30 nm e hexagonais de 90 nm, respectivamente (Salunke et al, 2014). O extrato de casca de *Annona*

squamosal apresentou um expressivo potencial para sintetizar NPs esféricas de dióxido de titânio (TiO₂), de prata (Ag) e de paládio (Pd) de 23, 35 e 80 nm, respectivamente (Roopan et al, 2012; Kumar et al, 2012; Roopan et al bis, 2012). A otimização das condições de síntese tais como a temperatura, o pH, o tempo de síntese, a concentração do extrato e do metal podem melhorar as características, a reprodutibilidade e o rendimento das NPMs (Ibrahim et al, 2015).

A escolha do solvente a ser utilizado para a extração de moléculas da planta pode ser considerada. Vários estudos investigaram o uso de diversos solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etilo, acetona, metanol) com o objetivo de comparar a eficiência no rendimento da síntese e na atividade biológica das NPMs (Zahir e Rahuman, 2012). Entretanto, a extração aquosa é preferencialmente utilizada na maioria dos trabalhos de síntese verde para garantir uma tecnologia limpa e uma maior biocompatibilidade das NPMs (Kumar et al, 2010).

As AgNPs são preferencialmente aplicadas como agentes antimicrobianos e antifúngicos (Iravani, 2011). Entretanto, vários estudos relacionados ao câncer estão demonstrando o grande potencial antitumoral de AgNPs obtidas via síntese verde (Tabela 2).

Tabela 2: Síntese verde de AgNPs e sua atividade antitumoral *in vitro*.

Planta (Parte da planta)	Tipo de extração	Diâmetro (nm) e formato das AgNPs	Tipo celular (Atividade antitumoral)	Referências
<i>Acorus calamus</i> (rizoma)	Aquosa	60 nm / esférico	Carcinoma espinocelular - CE	Nayak et al, 2015
<i>Calotropis gigantea</i> L. (látex)	Aquosa	5 – 30 nm / esférico	Carcinoma cervical humano - HeLa	Rajkuberan et al, 2014
<i>Cucurbita maxima</i> (pétala)	Aquosa	76 nm / esférico	Carcinoma espinocelular - CE	Nayak et al, 2015
<i>Eucalyptus chapmaniana</i> (folha)	Aquosa	60 nm	Leucemia humana - HL60	Sulaiman et al, 2013
<i>Gymnema sylvestre</i> (folha)	Aquosa	26 – 33 nm / esférico	Carcinoma laríngeo humano - Hep-2	Nakkala et al, 2015
<i>Morinda citrifolia</i> (raiz)	Aquosa	30 - 55 nm / esférico	Carcinoma cervical humano - HeLa	Suman et al, 2013
<i>Moringa oleifera</i> (casca)	Aquosa	40 nm / esférico e pentágono	Carcinoma cervical humano - HeLa	Vasanth et al, 2014
<i>Moringa oleifera</i> (folha)	Aquosa	95 nm / rectangular	Carcinoma espinocelular - CE	Nayak et al, 2015
<i>Podophyllum hexandrum</i> (folha)	Aquosa	14 nm / esférico	Carcinoma cervical humano - HeLa	Jeyaraj et al, 2013

Os estudos relacionados à atividade antitumoral de AgNPs obtidas por síntese verde ainda são escassos em relação ao número de publicações na área e existem poucas informações referentes aos mecanismos de ação. Portanto, novas investigações são necessárias para contribuir para o conhecimento dos mecanismos de ação anticancerígenos e a especificidade das AgNPs.

1.2.2.2 Planta de interesse para síntese verde de AgNPs: *Curcuma longa*

A *Curcuma longa* L., também conhecida como açafrão da Índia, cúrcuma ou turmérico, é uma planta herbácea da família Zingiberaceae originária de Ásia (Figura 9). Existem aproximadamente 133 espécies de *Curcuma* identificadas no mundo. A *C. longa* é constituída por mais de 200 componentes identificados e pertencentes aos grupos dos fenólicos, terpenos, esteroides, ácidos graxos entre outros (Li et al, 2011). Ao longo dos anos, a cultura de *C. longa* se espalhou para diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Entretanto, a Índia permanece como o maior produtor e exportador com 78% do mercado mundial (Salimath et al, 2014).

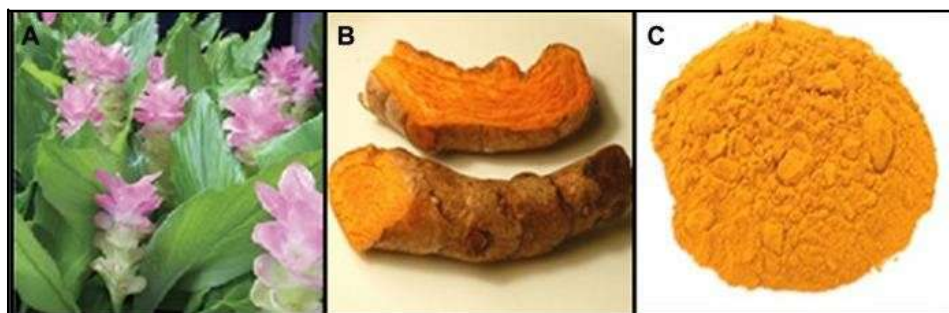


Figura 9: *Curcuma longa* L. Partes aéreas (A), tubérculo (B) e tubérculo em pó (C). (Imagens obtidas de Shameli et al, 2012).

Os primeiros registros do uso da planta provêm da cultura Védica na Índia há mais de 4000 anos, onde costumava ser usada como tempero na culinária local e durante as cerimônias religiosas (Prasad and Aggarwal, 2011). Na medicina tradicional chinesa e na medicina Ayurvédica, a *C. longa* é empregada como agente antibacteriano (em feridas e queimaduras), como agente anti-inflamatório (para purificar o sangue e a pele), no tratamento de doenças respiratórias, nos problemas de fígado entre outros (Prasad and Aggarwal, 2011).

Na medicina convencional, estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram as suas atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antiséptica, antimutagênica, anticancerígena, antioxidante e digestiva (Prasad and Aggarwal, 2011). Em 2012, Hishikawa e colaboradores demonstraram o seu efeito neuroprotetor melhorando os sintomas e as atividades de vida diárias de pacientes com Alzheimer. Essas propriedades estão associadas às moléculas que compõem a *C. longa*, e principalmente à classe dos curcumonoides representados pela curcumina (71,5%), pela demetoxicurcumina (19,4%) e pela bisdemetoxicurcumina (9,1%) (Li et al, 2011). A curcumina, ou diferuloilmetano, é um polifenol extraído do rizoma da *C. longa* e é o pigmento responsável pela coloração amarelada do extrato (Figura 10). Este composto foi isolado e identificado pela primeira vez em 1815 sendo considerado o principal princípio ativo da planta possuindo propriedades anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral e antidiabética (Joe et al, 2013). Em 2015, um grupo de pesquisa da Universidade de São Paulo (USP) da cidade de São Carlos, coordenado pelo doutor Vanderlei Bagnato, mostrou com sucesso o efeito tóxico da curcumina contra larvas de *Aedes aegypti*, vetor transmissor da dengue. Na área do tratamento do câncer, a curcumina apresenta um grande potencial e seus mecanismos de ação são frequentemente investigados (Shishodia et al, 2007). Em estudo relacionado ao CPM, a curcumina mostrou o potencial de promover o processo de apoptose em células tumorais (Chinembiri et al, 2014). Vários estudos relatados em uma revisão de Yallapu e colaboradores (2011) mostram que o potencial antitumoral da curcumina foi otimizado quando associada à nanocarreadores.

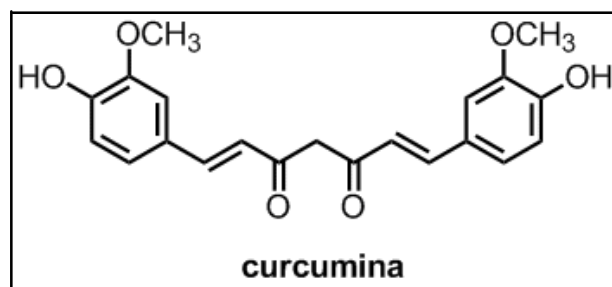


Figura 10: Estrutura química da curcumina (Li et al, 2011).

Devido às suas amplas propriedades e ao seu perfil fitoquímico, estudos já investigaram o potencial da *C. longa* para sintetizar AgNPs. Sathishkumar e colaboradores (2011) avaliaram a síntese de AgNPs a partir do extrato aquoso de tubérculo de *C. longa*. A síntese resultou na formação de AgNPs esféricas e homogêneas de 25 nm. Em vários estudos, Shameli e colaboradores (2012; 2014) relataram o sucesso da formação de AgNPs a partir do extrato aquoso do tubérculo de *C. longa*. Nadagouda e colaboradores (2014) relataram a obtenção de AgNPs e AuNPs a partir de extrato de *C. longa*. A escolha por esta planta foi devido aos componentes antioxidantes e antitumorais presentes no extrato como os polifenóis e a curcumina. Entretanto, nenhum estudo ainda foi relatado a respeito da atividade antitumoral em CE dessas AgNPs obtidas a partir de *C. longa*.

1.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NPMS – ASSOCIAÇÃO COM POLÍMEROS

Uma estratégia amplamente empregada para melhorar as propriedades das NPMS ou para torná-las mais biocompatíveis é a associação de NPMS com polímeros naturais e/ou sintéticos. A funcionalização da superfície de NPMS utilizando polímeros biocompatíveis como o polietilenoglicol ou a quitina contribui para impedir a agregação das estruturas e prolongar o tempo de vida na circulação *in vivo*,

possibilitando assim um melhor rendimento na entrega e na eficácia do medicamento (Conde et al, 2012; Venkatesham et al, 2012).

2.1 Quitosana

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante na natureza após a celulose. Além disso, é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, insetos e alguns fungos (Dash et al, 2011). A reação de desacetilação da quitina gera a quitosana, um copolímero constituído por unidades $\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-Dglucopirranose e $\beta(1,4)$ -2-acetamido-2-desoxi-Dglucopirranose (Dias et al, 2013) (Figura 11).

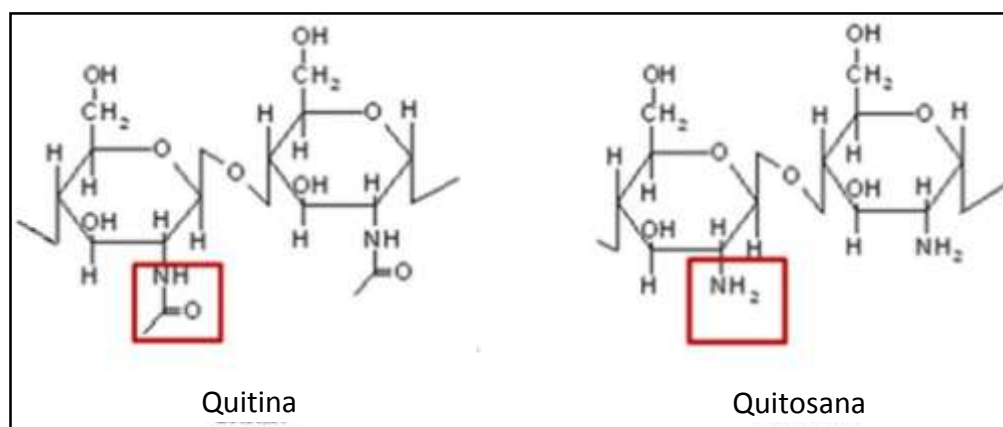


Figura 11: Estrutura química da quitina e da quitosana (Dias et al 2013).

A quitina foi identificada no início de século XIX pelo professor francês Henri Braconnot enquanto os primeiros relatos da quitosana foram descritos por Rouget em 1859. Após a sua descoberta, a quitosana passou a ser mais utilizada devido à baixa solubilidade de quitina (Dias et al 2013).

A quitosana possui propriedades físicas e químicas distintas de acordo com o seu grau de desacetilação e a sua massa molecular (Wang et al, 2011). Ambas são influenciadas por várias condições tais como temperatura, tempo, concentração e

outras condições atmosféricas envolvidas no processo de desacetilação da quitina (Dias et al 2013; Dash et al, 2011).

A quitosana apresenta três grupamentos funcionais: dois grupos hidroxila e um grupo amina primária. Este último é responsável pelas propriedades catiônica, hemostática e de insolubilidade da quitosana em pH acima de 6,5 (Dash et al, 2011). O seu caráter catiônico é responsável pelo uso da quitosana em diversas aplicações (Bernkop e Dunnhaupt, 2012). Suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioadesividade permitem a sua aplicação como base de liberação de fármacos e na interação/adesão de estruturas na superfície de células. Além disso, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o seu uso em formulação destinada a aplicações farmacêuticas (Ferreira et al, 2012).

O modo de administração da quitosana pode ser feita de diversas formas: oral, ocular, nasal, bucal, vaginal, parenteral, intravesical, por vacinas (Berkop et al 2013) e tópica (Sezer e Cevher, 2012). Estudos relataram que a quitosana melhora a absorção cutânea de medicamentos devido à combinação da sua propriedade de bioadesividade e do seu caráter catiônico que favorece as interações com as junções presentes entre as células dérmicas (Sezer e Cevher, 2012). Popat e colaboradores (2014) investigaram o uso de nanopartículas de quitosana para a aplicação tópica de curcumina modificada em linhagem de CPNM (SCC25). A quitosana melhorou a solubilidade do composto assim como permitiu uma melhor eficácia no tratamento do CPNM devido à sua carga positiva que interage com os componentes celulares (Popat et al, 2014). Em um outro estudo, o recobrimento de lipossomo com quitosana permitiu otimizar a permeação dérmica do medicamento resveratrol. O estudo relatou que a bioadesividade da

quitosana e a sua carga positiva foram diretamente ligadas a esta melhora da eficiência terapêutica (Park et al, 2013).

A quitosana é um dos polímeros mais utilizados como estabilizante na síntese de NPMs (Venkatesham et al, 2012). Boca e colaboradores (2011) recobriram AgNPs obtidas por síntese química com quitosana (CH-AgNPs) para prevenir a possível agregação entre as partículas e relataram o seu efeito antitumoral em células de câncer de pulmão de não-pequenas células humanas (NCI-H460). Além disso, as CH-AgNPs mostraram biocompatibilidade em células saudáveis, sugerindo que a aplicação de CH-AgNPs é uma alternativa no tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas, *in vitro* (Boca et al, 2011).

Além de agir como agente estabilizante na síntese de NPMs, a quitosana pode ser utilizada também como agente redutor. Venkatesham e colaboradores (2012) obtiveram AgNPs estáveis e homogêneas utilizando a quitosana como agente redutor e estabilizante. Sanpui e colaboradores (2011) desenvolveram um nanocarreador à base de quitosana para a liberação de baixa concentração de AgNPs. A síntese de AgNPs ocorreu simultaneamente com a formação do nanocarreador de quitosana que serviu como coagente redutor e agente estabilizante. O sistema promoveu uma expressiva toxicidade em células de adenocarcinoma humano (HT 29) agindo no mecanismo de apoptose (Sanpui et al, 2011). De acordo com este estudo, a utilização de AgNPs associadas a nanocarreadores de quitosana representa uma melhor abordagem no tratamento do câncer quando comparado ao uso de AgNPs livres. Este fato pode ser explicado pelas propriedades de biocompatibilidade e bioadesividade da quitosana que podem melhorar a interação com as células tumorais e, conseqüentemente, otimizar o efeito da Ag⁺ liberada pelas AgNPs.

Neste caso, até o momento, não foi encontrado nenhum estudo referente ao recobrimento de AgNPs a base de *C. longa* por quitosana e sua aplicação em linhagens de CE. A associação da quitosana com AgNPs já demonstraram possuir propriedades promissoras contra células cancerígenas. Portanto, investigações precisam ser ampliadas para explorar os efeitos das CH-AgNPs sintetizadas a base de *C. longa*.

2. JUSTIFICATIVA

O CP é o tipo de câncer de maior incidência no Brasil e no mundo. O CPNM desenvolve-se em queratinócitos presentes na epiderme e, apesar da baixa mortalidade, representa 97% dos casos de CP. O subtipo CE é o mais agressivo e está associado a 70% das mortes dentre os CPNM. Os tratamentos convencionais tais como a cirurgia, a terapia fotodinâmica e a quimioterapia tópica, entre outros, apresentam grandes chances de cura do CE. Entretanto, vários efeitos colaterais localizados e sistêmicos são relatados na literatura (Bahner e Bordeaux, 2013) limitando a sua aplicação. Dessa forma, é necessária a investigação para tratamentos e terapias inovadoras. Essas novas abordagens a serem desenvolvidas para combater o câncer podem ser utilizadas como alternativas ou servirem como adjuvantes aos tratamentos convencionais.

A prata é conhecida principalmente por sua atividade antimicrobiana. Contudo, alguns estudos mais recentes relataram o seu potencial antitumoral (Tan et al, 2010). Já se sabe que os íons Ag^+ livres apresentam uma baixa seletividade e uma alta toxicidade em células saudáveis não alvo uma vez que são liberados de uma vez no local da aplicação. Dessa forma, neste contexto, o uso da nanotecnologia pode minimizar esses efeitos indesejados e potencializar a atividade antitumoral. A formação de AgNPs por síntese química já demonstrou o seu grande potencial para controlar a proliferação celular em CE *in vitro* (Arora et al, 2008). Os íons Ag^+ que compõem as AgNPs podem ser liberados de forma sustentada e lenta, possibilitando um maior acúmulo em células tumorais. Deste modo, os efeitos adversos podem ser reduzidos, a ação pode ser mantida por mais tempo sem a necessidade de aplicar elevadas concentrações de Ag^+ .

A síntese verde de AgNPs está sendo cada vez mais empregada uma vez que essa abordagem pode estar livre do uso de solventes orgânicos e da formação de resíduos tóxicos prejudiciais para o ser humano e o meio ambiente. Além disso, a síntese verde apresenta um baixo custo de produção podendo ser empregada em indústrias e em larga escala. Dentre os organismos biológicos utilizados, as plantas possuem um grande destaque por serem de fácil acesso e por conter uma variedade muito significativa de biomoléculas/metabólitos biorredutores capazes de formar AgNPs. A planta de interesse deste estudo é a *Curcuma longa*, conhecida por suas propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antisséptica, antimutagênica, anticancerígena, antioxidante e digestiva (Prasad e Aggarwal, 2011). O principal agente ativo da *C. longa* é a curcumina, também muito estudada, por apresentar atividade antitumoral (Chinembiri et al, 2014). Shamelí e colaboradores (2014) demonstraram o potencial da *C. longa* para a síntese de AgNPs a partir do EA do tubérculo. Entretanto, não foram investigados os seus mecanismos de ação em células de CE. O conhecimento desses mecanismos permitirá direcionar melhor o tratamento e/ou redefinir os processos de síntese e de aplicação.

Por fim, o recobrimento da superfície das AgNPs com polímeros pode ser de grande relevância tanto na estabilidade das estruturas quanto na funcionalização destas. A quitosana é um polímero natural catiônico, biodegradável, biocompatível e bioadesivo. Portanto, o seu uso como agente estabilizante pode melhorar as interações das AgNPs obtidas a partir de EA de *C. longa* com as células cancerígenas e assim, potencializar o seu efeito biológico.

Diante desse cenário, a hipótese deste trabalho é que as AgNPs sintetizadas a partir do EA do tubérculo de *C. longa* e recobertas por quitosana apresentam um potencial no controle da proliferação de células do CE *in vitro*. Essa estratégia poderá representar no futuro uma alternativa para o tratamento do CE em aplicação tópica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar os efeitos citotóxicos e alguns mecanismos de ação de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas a partir de extrato aquoso do tubérculo de *C. longa*, recobertas ou não por polímeros de quitosana, em linhagem de células de câncer de pele não melanoma (A431) *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes métodos para preparação de extratos de *C. longa*;
- Otimizar a síntese de AgNPs (temperatura, concentração e tempo) a partir de extratos aquosos de tubérculo da *C. longa* por métodos de síntese verde;
- Revestir a superfície de AgNPs com polímeros de quitosana;
- Caracterizar os parâmetros físicoquímicos como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), carga de superfície e absorção na região do visível das nanoestruturas obtidas;
- Investigar a morfologia das nanoestruturas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (MFA);
- Avaliar a estabilidade das nanoestruturas desenvolvidas em função do tempo e de diferentes condições de armazenamento;
- Analisar os efeitos das nanoestruturas na viabilidade celular em células de queratinócitos, *in vitro*;

- Analisar os efeitos das nanoestruturas na viabilidade celular, na morfologia, na integridade de membrana e na proliferação de células de câncer de pele não melanoma da linhagem A431, *in vitro*;
- Analisar os efeitos das nanoestruturas na fragmentação de DNA, no ciclo celular, no potencial de membrana mitocondrial e na exposição de fosfatidilserina (marcador de morte celular por apoptose) de células de câncer de pele não melanoma da linhagem A431, *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

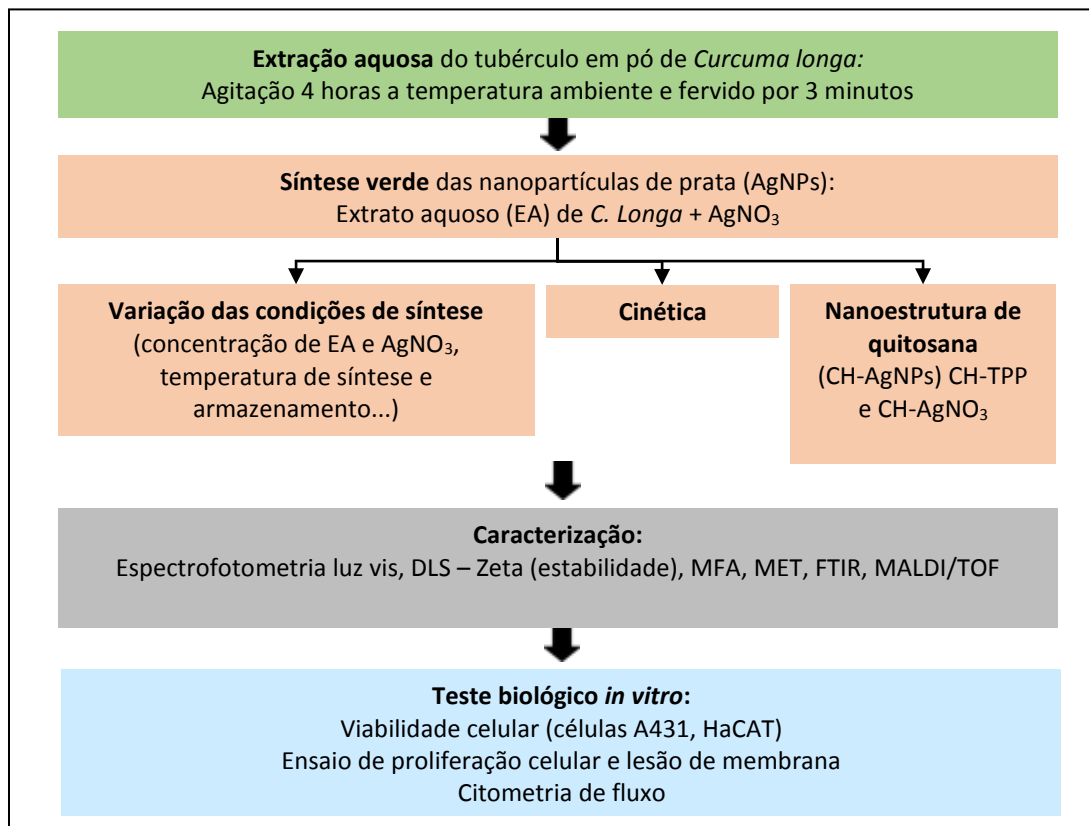


Figura 12: Esquema do desenho experimental

4.2 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) A PARTIR DO TUBÉRCULO DA *C. longa*

4.2.1 Preparação do extrato aquoso (EA) de *C. longa*

Tubérculos de *C. longa* foram coletados em uma plantação não comercial em uma propriedade privada (Fazenda Coqueiro) no município de Colinas do Sul, Goiás, Brasil. Antes da sua utilização, o tubérculo foi lavado com água corrente, seco ao ar por 10 dias, triturado e moído até se obter um pó fino e mantido em temperatura ambiente.

A preparação dos extratos foi realizada no Laboratório de Prospecção de Compostos Bioativos (LPCB) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia coordenado pela Dra Vera Lúcia Perussi Polez e pelo Dr. Thales Lima Rocha. O extrato aquoso (EA) foi

preparado com base em protocolo de Shameli e colaboradores (2012, 2014) no dia da síntese na concentração de 2 mg/mL adicionando-se 40 mg de *C. longa* (em pó) em 20 mL de água ultrapura (pH=7).

Dois métodos de obtenção do EA foram testados a fim de se determinar o mais eficiente para a síntese. No primeiro método, o EA permaneceu sob agitação magnética durante 4 horas no escuro à temperatura ambiente. Parte da amostra foi filtrada em papel filtro (poros de 14 µm) e a outra parte foi centrifugada a 3083 g por 5 minutos à temperatura ambiente. No segundo método, o EA de *C. longa* foi fervido por 3 minutos e filtrado em papel filtro (poros de 14 µm). Ambos foram utilizados na síntese de AgNPs como descrito abaixo.

4.2.2 Síntese verde de AgNPs

A síntese verde de AgNPs foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com base em protocolo de Shameli e colaboradores (2012, 2014) e em protocolos de síntese verde de AgNPs estabelecidos no Grupo de Pesquisa liderado pelo Dr. Luciano Paulino da Silva a partir de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) a 1 mM (concentração final) adicionada ao EA filtrado ou centrifugado de *C. longa* em várias concentrações. A reação da síntese foi realizada em tubos de ensaio de vidro (volume final da reação = 5 mL) os quais foram colocados em banho-maria (Quimis, Brasil) por 24 horas para o controle da temperatura de síntese. Os tubos foram tampados com papel alumínio para minimizar a evaporação. Durante a síntese, os íons prata são reduzidos em uma forma neutra (metálica) por compostos redutores presentes no EA. A síntese ocorreu ao abrigo da

luz e foi monitorada por 24 horas em diferentes temperaturas. Soluções contendo apenas AgNO_3 a 1 mM ou EA foram testados como controles da reação.

Após o tempo da reação de síntese, 50 μL de cada amostra diluídos em 100 μL de água ultrapura foram colocados em uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida em uma ampla faixa de comprimento de onda (350-750 nm) utilizando um espectrofotômetro de luz na região do visível (Molecular Devices, EUA) no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Diferentes condições foram testadas para determinar a mais adequada para a síntese de AgNPs. Essas condições estão apresentadas a seguir e as características das amostras foram avaliadas por espectrometria de luz UV-visível e por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) descrito no item 4.6.1.

4.2.2.1 Efeito da temperatura de síntese

A síntese de AgNPs foi avaliada ao abrigo da luz em diferentes temperaturas: 0°C, 25°C, 50°C e 75°C durante 24 horas com EA na concentração final de 1 mg/mL e solução aquosa de AgNO_3 na concentração final de 1 mM com base em modificação de protocolo estabelecido por Bonatto e Silva (2014). O volume final da reação foi de 5 mL.

4.2.2.2 Efeito da concentração do extrato aquoso e do nitrato de prata (AgNO_3)

Para avaliar o efeito da concentração do extrato no processo de síntese, diferentes concentrações do EA (0,25 / 0,5 / 1,0 e 2,0 mg/mL) foram incubadas juntamente com uma solução de AgNO_3 (concentração fixa de 1 mM) a 75°C durante 24 horas. Para avaliar o efeito da concentração final de AgNO_3 no processo de síntese, diferentes concentrações de AgNO_3 (0,25 / 0,5 e 1 mM) foram adicionadas à

concentração fixa de 0,25 mg/mL de EA e incubadas a 75°C durante 24 horas. O volume final de cada reação foi ajustado para 5 mL com água ultrapura.

4.2.2.3 Efeito da temperatura de armazenamento do tubérculo em pó

O EA da *C. longa* foi preparado a 2 mg/mL como descrito no item 4.2.1 após armazenar o pó por 30 dias a temperatura ambiente ou a -20°C. Em seguida, 2,5 mL de amostras foram adicionadas a 2,5 mL de uma solução de nitrato de prata AgNO₃ ao abrigo da luz e incubadas a 75°C durante 24 horas para avaliar a influência da temperatura de armazenamento do pó na síntese de AgNPs. As concentrações finais de EA e de AgNO₃ foram de 1,0 mg/mL e 1 mM, respectivamente.

4.2.2.4 Efeito da influência de gases atmosféricos

O uso de um frasco reator hermeticamente fechado (HJ usinagem, Brasil) (Figura 13) impede os gases atmosféricos de penetrar e influenciar nos processos de síntese. Portanto, a formação de AgNPs foi monitorada a partir do uso do reator para avaliar a importância da presença de oxigênio durante a redução da prata. Dessa forma, 2,5 mL de EA foram adicionadas a 2,5 mL de uma solução de AgNO₃, de 1 mg/mL e 1 mM, respectivamente. A síntese ocorreu ao abrigo da luz a 75°C em uma estufa durante 24 horas. Uma síntese controle foi realizada nas mesmas condições em tubos de ensaio tampados por papel alumínio



Figura 13: Frasco reator utilizado na síntese verde de AgNPs a partir de 1 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃.

4.2.3 Cinética da síntese

A cinética da síntese de AgNPs (1 mg/mL de EA e 1 mM de AgNO₃) foi realizada em tubos de ensaio de vidro a 75°C durante 48 horas, ao abrigo da luz. A cada duas horas, 1 mL de cada amostra foi retirado para medir a absorbância a 450 nm via espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA) e colocado de volta para o tubo de ensaio para manter o volume final de 5 mL. Após 0, 6, 12 e 24 horas de síntese, 50 µL das amostras diluídas em 100 µL de água ultra pura foram analisados por espectrofotômetro de luz visível em uma ampla faixa de comprimentos de onda (350-750nm).

4.3 EFEITO DA SECAGEM DAS AgNPs

As AgNPs sintetizadas foram congeladas em nitrogênio líquido para serem em seguida secas a partir dos métodos de liofilização (Liotop) e centrífugo tipo Speed vac® (Labconco SPV). Após a secagem, as AgNPs foram ressuspensas em 5 mL de água ultra pura para manter o volume inicial e as suas propriedades físicoquímicas foram avaliadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico descrita posteriormente.

4.4 RECOBRIMENTO DA SUPERFÍCIE DAS AgNPs COM QUITOSANA PELO MÉTODO DE GELEIFICAÇÃO IÔNICA

Uma solução de quitosana de baixa massa molecular (Sigma, EUA) foi preparada a 2,5 mg/mL contendo 0,3 % de ácido acético (Vetec, EUA). A solução foi colocada em recipiente fechado e permaneceu sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente até a dissolução da quitosana. Logo após, a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm. Em paralelo, uma solução estoque de tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma, EUA) foi preparada a 16 mg/mL. Esses passos foram realizados de acordo

com o protocolo descrito por Fábregas e colaboradores (2013). Em seguida, 875 µL de AgNPs previamente sintetizadas e 125 µL de TPP (16 mg/mL) foram misturados em um microtubo antes de serem adicionados a 2 mL de solução de quitosana. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 15 minutos a temperatura ambiente com as concentrações finais de 49 µg/mL de AgNPs (considerando a concentração de AgNO₃); 1,6 mg/mL de quitosana e 0,6 mg/mL de TPP. Nanopartículas de quitosana sem AgNPs (CH-TPP) e nanopartículas de quitosana associadas à AgNO₃ livre (CH-Ag) foram também sintetizadas. As concentrações finais de quitosana, TPP e AgNO₃ foram de 2 mg/mL, 1 mg/mL e 49 µg/mL, respectivamente.

4.5 ESTABILIDADE DAS AgNPs e CH-AgNPs

As AgNPs que apresentaram um pico de ressonância plasmônica na região do visível foram selecionadas para a avaliação da estabilidade a temperaturas de armazenamento de -20°C, 4°C ou 25°C. A estabilidade das AgNPs foi monitorada de ao longo do tempo (1, 7, 15 e 30 dias) pelos métodos de caracterização descritos no item 4.6.1.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS

4.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

As AgNPs, as CH-AgNPs e os controles (extrato livre, AgNO₃ livre, CH-TPP e CH-AgNO₃) foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta de superfície (ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern,UK)) no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB). Estas técnicas fornecem informações referentes ao diâmetro hidrodinâmico (DH) a partir do movimento Browniano de partículas dispersas em meio líquido. Uma camada de

solvatação se forma ao redor dessas partículas, o que resulta em uma superestimação do DH. O tamanho é obtido de acordo com a distribuição em intensidade. A partir dessa informação, as distribuições em número e em volume são geradas considerando uma solução contendo duas populações de partículas de tamanho diferente em igual proporção (Figura 14). O índice de polidispersão (Pdl) é um dado importante e corresponde à variação do tamanho dentro de uma amostra relativa à sua distribuição em intensidade. O seu valor varia de 0 a 1, sendo que quanto menor o valor, mais monodispersa é a amostra. Além disso, o DLS determina a carga de superfície (potencial Zeta) das partículas, indicando a estabilidade coloidal desta.

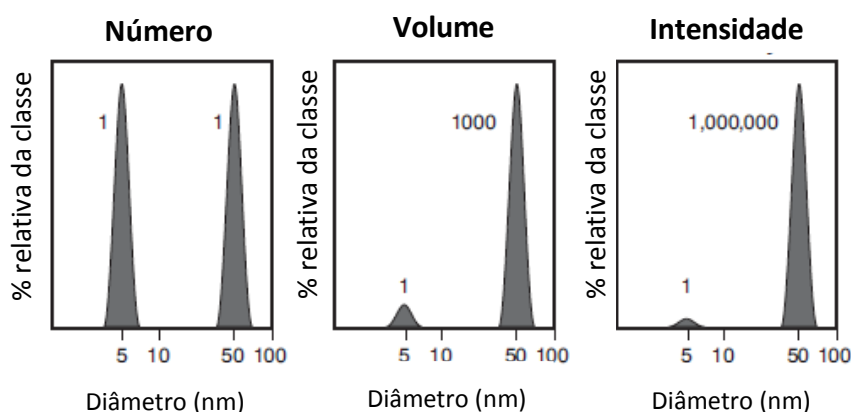


Figura 14: Representação das distribuições de partículas em número, volume e intensidade a partir de análise por Espalhamento de luz dinâmico (DLS). Adaptado de Malvern, 2004.

As amostras foram analisadas após diluição em água ultrapura (1:10, v/v). As medidas foram realizadas em triplicata, em um ângulo de espalhamento fixo de 90° e a 25°C. A representação dos resultados foi feita a partir do DH em número e em intensidade (Z-average), do Pdl e do potencial Zeta utilizando a versão 7.04 do software ZetaSizer. Os valores foram representados pela média \pm desvio padrão da média e os gráficos foram plotados no programa Prism®5.

4.6.2 Microscopia de força atômica (MFA)

As AgNPs e CH-AgNPs foram analisadas por MFA no Laboratório de Espectrometria de Massa – Sala de Nanobiotecnologia, atualmente Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Um microlitro (μL) de AgNPs e 1 μL de CH-AgNPs diluídas em água ultra pura (1:10 e 1:20 (v/v), respectivamente) foram depositados na superfície de uma mica muscovita recém clivada. As amostras foram cobertas com uma placa de Petri e secas em condições ambientais. As análises foram realizadas utilizando o MFA SPM-9600 (Shimadzu, Japão) com um escâner de 125 μm x 125 μm em modo dinâmico-fase. Este modo fornece informação sobre a altura, o formato e a topografia das amostras. Um cantilever associado a uma ponteira cônica de silício foi utilizado para as análises usando uma constante de mola de aproximadamente 42 N/m e uma frequência de 1 Hz. Várias áreas de 10 μm x 10 μm foram avaliadas em uma resolução de 512 x 512 e as imagens foram processadas utilizando o software (SPM Manager 3.0 Off-line, Shimadzu) que acompanha o microscópio.

4.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e CH-AgNO₃ foram analisadas por MET no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília com o auxílio do Dr. Claudio Afonso Pinho Lopes. Esta técnica fornece informações sobre o tamanho e formato das AgNPs. Após diluição das amostras em água ultrapura (1:10, v/v), 2 μL de cada uma delas foram aplicados em um suporte de cobre recoberto por uma resina de *Formvar*. Após 24 horas de secagem à temperatura ambiente, o suporte contendo a amostra foi introduzido no

microscópio JEM-1011 (Jeol, Japão). As imagens foram obtidas em um aumento de 250.000 ×. Cada imagem foi analisada com o auxílio do software *Image Pro Plus* para determinar as faixas de tamanho das partículas e gerar um histograma de distribuição de diâmetros.

4.6.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As AgNPs, CH-AgNPs e os controles foram liofilizados (Liotop) e analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (modelo IR Prestige 21, Shimadzu, Japão) no Laboratório de Instrumentação Analítica (UnB, Campus Ceilândia) com auxílio do técnico Diego Juscelino Santos Dias. Esta metodologia permite determinar os grupamentos químicos presentes em cada amostra e identificar quais possíveis classes de biomoléculas são responsáveis pelo processo de redução de íons Ag⁺ e pelo recobrimento das AgNPs. Todo o material utilizado para o preparo das amostras foi previamente lavado com uma solução de acetona para evitar o processo de oxidação. Durante o preparo das amostras para a análise, a proporção de brometo de potássio (KBr, Shimadzu, Japão) e de amostra deve ser de aproximadamente 95 e 5 % (m/m), respectivamente. Dessa forma, 70 mg de KBr foram misturados a 3,5 mg de amostra previa. As misturas foram prensadas a 80,0 kN por 3 minutos e as pastilhas obtidas foram mantidas em estufa a 100°C até a análise. Durante a leitura de cada amostra, 45 scans foram registrados com uma resolução de 4,0 cm⁻¹ na escala de onda de 400,0 e 4.000,0 cm⁻¹ no modo de porcentagem de transmitância. Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o programa Prism 5 (EUA).

4.6.5 Espectrometria de massa de ionização e dessorção à laser assistida por matriz e análise por tempo de voo (MALDI/TOF)

As AgNPs, as CH-AgNPs e os controles foram diluídos em água ultrapura (1:100, v/v). Um microlitro (μL) de cada amostra diluída foi em seguida aplicado em triplicata em uma placa AnchorChip var/96 MALDI (Bruker Daltonics, Alemanha). Após secagem à temperatura ambiente, 1 μL de uma solução saturada de matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL), previamente preparada, foi depositada. Logo após secagem, as amostras cristalizadas foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonics) em modo refletido/positivo na faixa de m/z 100-1000 no laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com auxílio da aluna de doutorado Cínthia Caetano Bonatto. Os íons típicos da matriz foram utilizados para realizar a calibração externa. A aquisição dos espectros ocorreu automaticamente utilizando-se procedimento padrão com acumulação de 1000 disparos de laser a 60 Hz.

4.7 CULTURA DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

A linhagem de CPNM utilizada (A431) foi comprada da *American Type Culture Collection* (ATCC). A linhagem de queratinócitos humanos (HaCAT) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Ambas são linhagens isoladas de humano. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília. As células foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm^2 contendo 10 mL de meio de cultura completo: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Life, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (Life, EUA) e 1%

de antibiótico (Penicilina – Streptomicina, Life, EUA) (v/v), e mantidas em estufa umidificada (Thermo Scientific, EUA) a 37°C e 5% de CO₂.

4.7.1 Tripsinização das células

As linhagens celulares utilizadas (A431 e HaCAT) são aderentes. Dessa forma, a tripsina, uma enzima que hidrolisa as ligações peptídicas, foi utilizada para soltar as células da superfície de garrafa de cultura. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi descartado e 5 mL de tripsina (Tripsina 0,25%, Life, EUA) foram adicionados. As células foram incubadas por 7 a 10 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após observar por microscopia de luz que todas as células estavam soltas, 5 mL de meio de cultura completo foram adicionados para neutralizar o efeito da tripsina. O conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Após 3 minutos de centrifugação a 1341 *g* a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* formado foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura e utilizado nos passos descritos a seguir.

4.7.2 Plaqueamento das células

Dez microlitros (μL) das células ressuscitadas em 1 mL de meio de cultura foram separados em um microtubo de 0,6 mL e 90 μL de azul de tripan foram adicionados. Após homogeneização, 10 μL foram colocados em uma câmara de Neubauer e as células foram contadas em microscópio de luz invertido. O número de células foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \text{N}^\circ \text{ de células contadas} / \text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10000$$

Foram adicionadas 3000 células/poço em placa de 96 poços de fundo achatado. Após o plaqueamento, as placas contendo as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.7.3 Tratamento

Os grupos dos tratamentos experimentais estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Siglas de identificação dos grupos de tratamentos experimentais.

SIGLAS	AMOSTRAS REFERENTES
AgNPs	Nanopartículas de prata sintetizadas a partir do EA de <i>C. longa</i>
AgNO₃	Nitrato de prata livre – controle da síntese de AgNPs
Extrato livre	Extrato aquoso de <i>C. longa</i> - como controle da síntese de AgNPs
EA	Extrato aquoso de <i>C. longa</i> livre estoque
CH-AgNPs	Nanopartículas de prata associada à quitosana
CH-TPP	Nanopartículas de quitosana
CH-AgNO₃	Nanopartículas de quitosana associada ao nitrato de prata livre

As AgNPs, as CH-AgNPs e os controles (extrato livre, AgNO₃ livre, CH-TPP e CH-Ag) foram previamente preparados em microtubos de polipropileno de 2 mL e diluídas em meio de cultura completo para obter as concentrações de 20 – 40 – 50 – 60 e 80 µM, referente à concentração do AgNO₃. Devido à presença de ácido acético nas formulações de CH-AgNPs, CH-TPP e CH-Ag, o ajuste do pH para 7 foi feito utilizando-se uma solução de NaOH 10 M e confirmado com fita indicadora de pH. Com o pH ajustado o meio deveria mudar da coloração amarelada a uma coloração rosa parecida com a do controle negativo. A amostra de controle negativo foi preparada com água ultrapura em meio de cultura completo adicionando-se volumes equivalentes aos volumes acrescentados para os grupos experimentais.

Para a aplicação do tratamento nas células, o meio de cultura de cada poço foi descartado na medida em que eram adicionados 200 μL das diferentes amostras citadas acima (20 – 40 – 50 – 60 e 80 μM). As placas foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 e 72 horas.

4.8 TESTES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

4.8.1 Teste de viabilidade celular – ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol)

Após 24 e 72 horas de exposição das células às diferentes concentrações das amostras, o ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT foi realizado. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução do MTT (amarelo) pela ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH em cristais de formazan (azul). O meio de cultura contendo as diferentes amostras foi retirado da placa e 150 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura completo – 15 μL de MTT (Life, EUA) com 135 μL de meio de cultura) foram adicionados a cada poço. Após 2 horas na estufa a 37°C e 5% de CO_2 , a solução de MTT foi descartada e 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EUA) foram acrescentados em cada poço da placa para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância dos poços foi avaliada por espectrofotômetro (Molecular devices, EUA) a 595 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do controle negativo (água ultrapura) como 100% de viabilidade.

4.8.2 Avaliação da morfologia das células por microscopia de luz

A mudança da morfologia das células após exposição a um tratamento é um sinal importante de que houve citotoxicidade. O processo de plaqueamento descrito acima (item 4.7.2) foi realizado para o teste de morfologia celular utilizando-se placa de 24 poços com fundo achatado. Um volume de 500 µL de meio de cultura contendo 10^4 células foi colocado em cada poço. Após 24 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂, o tratamento com AgNPs, CH-AgNPs, AgNO₃ livre e controle negativo foi realizado em triplicata na concentração de 50 µM e em tempos diferentes até completar 24 horas. A concentração de 50 µM foi escolhida por apresentar uma diminuição da viabilidade celular de aproximadamente 50% em linhagem de CE (A431). Cada triplicata corresponde aos tempos de 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 6 – 12 - 24 horas de tratamento. Após 24 horas, a avaliação da morfologia das células foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase (Zeiss, Axio, Alemanha) utilizando o programa AxioCam MRC3 S/N 4166 no Laboratório de Biologia de Peixe-Biopieces do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

4.8.3 Citometria de fluxo (FACS)

A citometria de fluxo é uma técnica que permite contar, examinar e classificar partículas microscópicas em suspensão. Vários parâmetros físicos, químicos e biológicos podem ser avaliados simultaneamente (Carvalho et al, 2010). As análises foram realizadas no citômetro (BD FACSVerse™, EUA) do Departamento de Biologia Celular no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Para a realização dos experimentos, placas de 12 poços com fundo achatado foram utilizadas. As células em cultura foram tripsinizadas e contadas de acordo com os procedimentos descritos

nos itens 3.5.1 e 3.5.2. O volume de 1 mL de meio de cultura contendo 5×10^4 células foi adicionado em cada poço das placas. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o tratamento das células foi realizado com as AgNPs, CH-AgNPs, AgNO_3 livre, CH-TPP na concentração de $50 \mu\text{M}$, o controle negativo (água ultrapura) e o controle positivo (peróxido de hidrogênio – H_2O_2). Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o sobrenadante de cada poço foi coletado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL correspondentes a cada um dos poços. As células foram tripsinizadas com $400 \mu\text{L}$ de tripsina e a placa foi incubada na estufa por 5 minutos. O sobrenadante coletado previamente foi colocado novamente em cada poço correspondente da placa para neutralizar o efeito da tripsina. As células foram ressuspendidas e coletadas novamente nos microtubos correspondentes para centrifugação a $3083 g$, por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em PBS $1\times$ e centrifugado novamente para retirar o excesso de meio de cultura e tratamento. Em seguida, as células foram processadas de acordo com cada experimento conforme descrito abaixo. Durante as análises por citometria de fluxo (FACS), 10000 eventos foram adquiridos para cada amostra e cada experimento.

4.8.3.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular

A avaliação de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas foi determinada com a adição de iodeto de propídeo (PI). O PI é um dos corantes com afinidade por DNA mais utilizados em citometria de fluxo (FACS) por ser capaz de se intercalar entre pequenas sequências de nucleotídeos (Carvalho et al, 2010).

O *pellet* de células tratadas foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% gelado e armazenado a -20°C por pelo menos 24 horas ou até o dia da análise. No dia da

análise, cada microtubo foi centrifugado a 3083 *g*, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com PBS 1× e centrifugadas novamente. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de PBS 1× contendo RNase (50 µM) foram adicionados ao *pellet*. As amostras foram incubadas na estufa a 37°C por 30 minutos protegidos da luz. Em seguida, 100 µL de PI (20 µg/mL) (Probes – Thermo Fisher, EUA) preparado em PBS foram adicionados à temperatura ambiente por 30 minutos protegidos da luz. Após esse procedimento, as células foram analisadas por FACS.

4.8.3.2 Potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada pela adição de Rodamina 123 (Probes – Thermo Fisher, EUA). A Rodamina 123 é um composto catiônico de fluorescência verde que se associa às membranas das mitocôndrias de acordo com a sua polarização (TermoFisher, 2015). A solução estoque de Rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL. O volume de 300 µL de Rodamina 123 (5 µg/mL) em PBS foi adicionado ao *pellet* das células tratadas e incubado por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3083 *g*, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 300 µL de PBS foram acrescentados. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirar o excesso de Rodamina 123. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo e analisadas por FACS imediatamente.

4.8.3.3 Exposição de fosfatidilserina

A fosfatidilserina é um fosfolípídeo presente na superfície interna da membrana plasmática das células. Durante o processo de apoptose, ela é translocada

para a camada externa da membrana funcionando assim como sinalizador para a fagocitose. A Anexina V é uma proteína utilizada para identificar as células em fase inicial de apoptose por possuir uma alta afinidade à fosfatidilserina. Nas análises por FACS, a Anexina está associada a um fluorocromo tipo FITC e é usada simultaneamente com o PI. Somente as células mortas ou com membrana danificada são permeáveis ao PI que é um indicador de apoptose tardia e/ou de morte celular por necrose (BD Pharmingen™).

O paclitaxel (PTX) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração de 50 nM e 29,4 μ M, respectivamente, foram utilizados com controles positivos de mortes celulares por apoptose e necrose, respectivamente. O PTX é um medicamento que se liga à tubulina, proteína do citoesqueleto das células, reduzindo a proliferação celular e levando à morte celular por apoptose. Em paralelo, o H_2O_2 é um agente oxidante que age diretamente na membrana lipídica e no DNA, levando a ruptura da membrana, ocasionando morte celular por necrose.

O *pellet* das células tratadas foi ressuspendido em 500 μ L de PBS gelado e centrifugado a 3083 *g*, por 5 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, 100 μ L de tampão de ligação (0,1 M de HEPES (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de $CaCl_2$) foi adicionado ao *pellet*. Em seguida, 5 μ L de solução de Anexina V (BD, EUA) e 10 μ L de solução de PI (50 μ g/mL) foram acrescentados em cada microtubo. A mistura foi deixada por 15 minutos protegida da luz a temperatura ambiente. Logo em seguida, 300 μ L de tampão de ligação foram acrescentados. As amostras foram colocadas em gelo e analisadas por FACS imediatamente.

4.8.4 Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular

O processo de plaqueamento descrito acima (item 4.7.2) foi realizado para o teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular utilizando-se placa de 12 poços com fundo achatado contendo 5×10^4 células/poço. Após 24 horas de exposição aos diferentes tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi ressuspenso em 100 μ L de meio de cultura completo (item 3.6.4). Dez μ L de suspensão de células foram retirados e adicionados a uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA) na proporção de 1:1 (v/v). O número de células totais foi determinado em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 4.7.2, contando-se células com coloração azul e não azuis. Este ensaio permite diferenciar as células viáveis ou não viáveis de acordo com o estado da membrana plasmática. O azul de tripan penetra nas células que apresentam membrana plasmática danificada e as coram de azul. As células viáveis com membrana intacta não apresentam coloração.

4.9 TESTES ESTATÍSTICOS

Todos os resultados de caracterização e ensaios celulares foram obtidos em triplicata e apresentados como a média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Prism 5.01 (EUA). As possíveis diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) de um fator e pelo post teste Bonferroni, considerando-se estatisticamente significativo $P < 0,05$. Os gráficos foram plotados no programa Prism 5.01.

4.10 REFERÊNCIAS

As referências deste trabalho foram organizadas e processadas utilizando o programa Mendeley® (Reino Unido).

5 RESULTADOS

5.1 SÍNTESE VERDE DE AgNPs

5.1.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA SÍNTESE DE AgNPs

O EA de tubérculo de *C. longa* foi utilizado como fonte de moléculas redutoras e estabilizantes para a síntese de AgNPs. O AgNO₃ foi escolhido como sal precursor. Sabe-se que a variação de alguns parâmetros físicoquímicos durante a síntese de NPMs pode influenciar a eficiência da síntese e as características das partículas (Akhart et al, 2013; Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014). Portanto, diferentes parâmetros foram testados com a finalidade de otimizar a síntese de AgNPs a partir de EA de *C. longa*.

O método de extração, a temperatura de síntese, a concentração de EA, a concentração de AgNO₃, a temperatura de armazenamento de *C. longa* e o uso de frasco reator (hermeticamente fechado) foram os parâmetros avaliados e apresentados a seguir.

5.1.1.1 Efeitos da preparação do extrato aquoso (EA) da *Curcuma longa*

O primeiro método de extração foi realizado sob agitação magnética por 4 horas a temperatura ambiente. Metade do EA obtido foi centrifugada e a outra metade foi filtrada em papel filtro. Em seguida, cada extrato (1 mg/mL) foi misturado a uma solução de AgNO₃ na concentração de 1 mM. Após 24 horas de síntese a 75°C, foi possível detectar visualmente a mudança de coloração da solução contendo AgNPs que passou de um amarelo claro (cor do EA) a um marrom-alaranjado. Essa mudança de coloração foi observada nos tubos (1) e (3) da foto ilustrada na figura 15 indicando que os componentes da *C. longa* reduziram os íons prata. Os tubos (2), (4) e (5)

correspondentes ao extrato centrifugado, extrato filtrado e AgNO_3 , respectivamente, permaneceram transparentes (Figura 15).

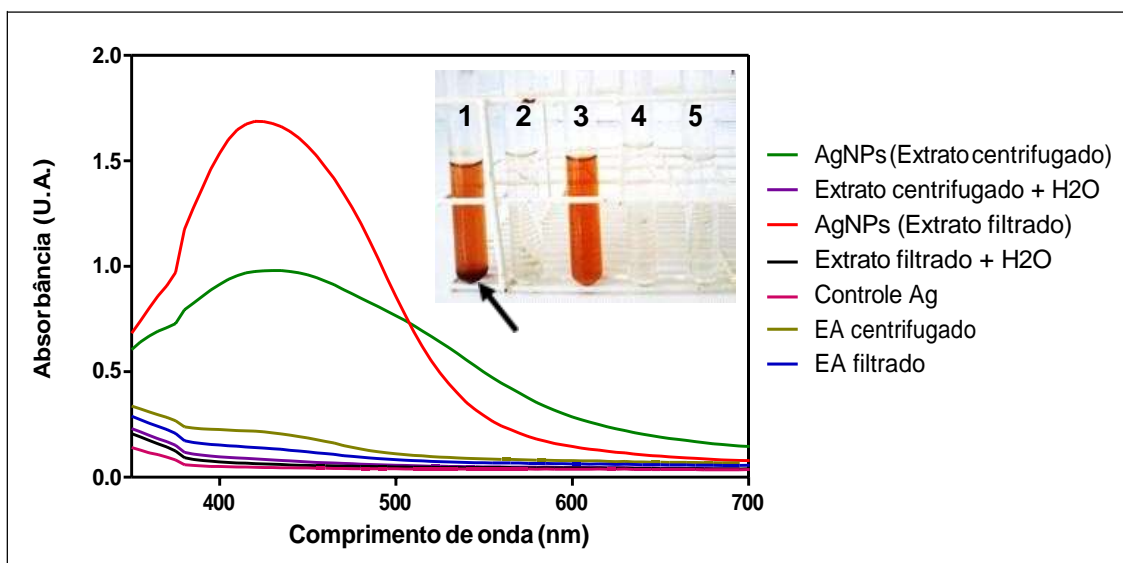


Figura 15: Espectro de absorção de luz visível de AgNPs sintetizadas a partir de EA de *C. longa* (1mg/mL) centrifugado ou filtrado em papel filtro. A síntese foi realizada a 75°C durante 24 horas com 1 mM de AgNO_3 . Legenda da foto: (1) AgNPs (extrato centrifugado) com precipitado (seta); (2) extrato centrifugado + H_2O ; (3) AgNPs (extrato filtrado); (4) extrato filtrado + H_2O e (5) AgNO_3 .

A figura 15 apresenta um espectro de absorbância das amostras após a síntese obtido por espectrometria de luz na região da luz visível. No presente trabalho, um pico mais intenso no comprimento de onda de 425 nm foi observado para o EA de *C. longa* filtrado adicionado à solução de AgNO_3 (Figura 15 - tubo 3). Pode-se observar na foto da figura 15 que o EA da *C. longa* centrifugado e misturado com AgNO_3 (tubo 1) apresentou um precipitado (seta) que pode interferir na formação e na estabilidade das AgNPs. Além disso, a amostra apresentou um pico de ressonância plasmônica de superfície (RPS) de menor intensidade quando comparado com o EA filtrado (tubo 3).

O segundo método de extração aquosa foi realizado por aquecimento do tubérculo de *C. longa* a 100°C por 3 minutos. O EA obtido foi em seguida filtrado por

papel filtro e utilizado imediatamente para a síntese verde de AgNPs nas mesmas condições citadas acima. A figura 16 representa o espectro de absorção de luz visível das amostras diluídas em água ultrapura (1:3, v/v) após 24 horas de síntese. A RPS das AgNPs sintetizadas (tubo 1) está representada por um pico de absorbância a 425 nm. A diluição realizada na proporção de 1:3 (v/v) em água ultrapura para a análise por espectrometria de luz visível foi necessária devido à coloração intensa da amostra contendo as AgNPs. A síntese apresentou, conseqüentemente, uma maior eficiência comparando com a síntese realizada com o primeiro método de extração. Os tubos (2) e (3) correspondentes ao extrato e AgNO_3 , respectivamente, não apresentaram mudança de coloração e pico de absorção.

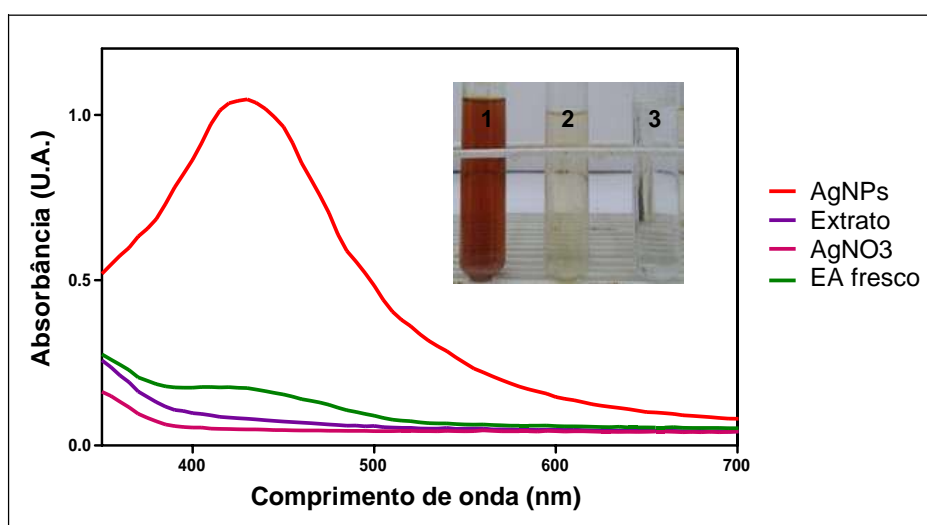


Figura 16: Espectro de absorção de luz visível de AgNPs sintetizadas a partir de EA de *C. longa* (1mg/mL) fervido e filtrado em papel filtro. A síntese foi realizada a 75°C durante 24 horas com 1 mM de AgNO_3 . Legenda da foto: (1) AgNPs; (2) extrato e (3) AgNO_3 .

Diante desses resultados, todas as sínteses descritas a seguir foram realizadas utilizando-se o EA de *C. longa* fervido por 3 minutos e filtrado em papel filtro.

5.1.1.2 Efeitos da temperatura na formação de AgNPs

Para determinar a temperatura mais adequada para a formação de AgNPs a partir de EA filtrado de *C. longa* a 1 mg/mL e AgNO₃ a 1 mM, a síntese foi realizada a 0, 25, 50 e 75°C durante 24 horas. Pode-se observar na foto da figura 17 uma gradação de coloração de acordo com a temperatura de síntese indicando que este fator é relevante para a formação de AgNPs. Entretanto, apenas a síntese realizada a 75°C apresentou um pico de RPS a 425 nm (Figura 17), referente à presença de AgNPs em suspensão. Dessa forma, a temperatura de 75°C foi utilizada para as demais sínteses.

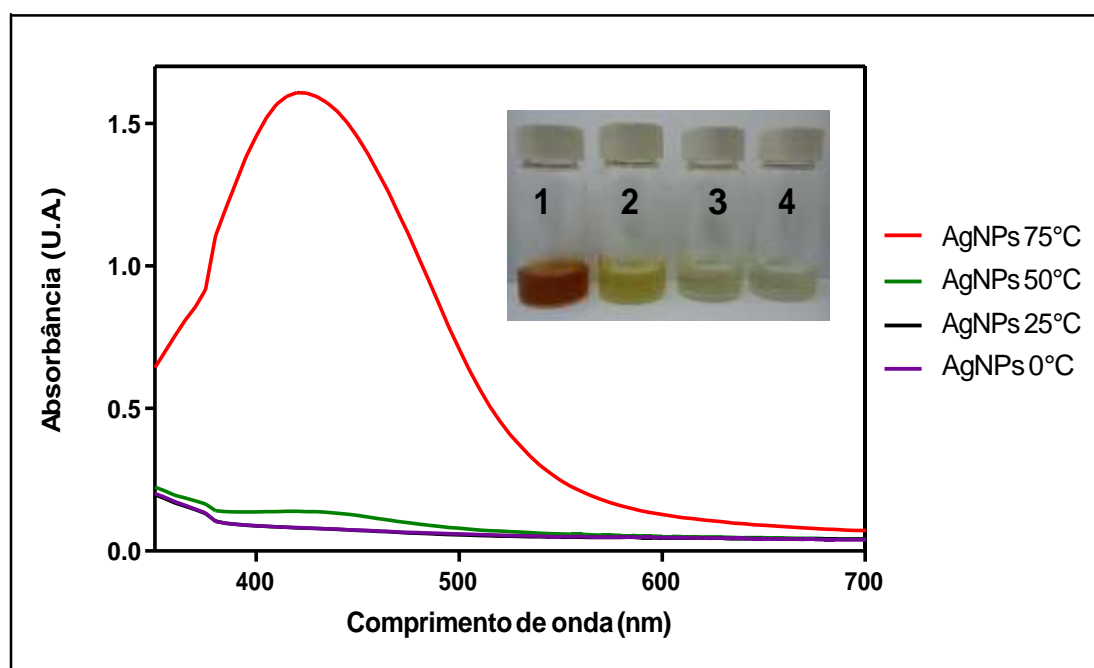


Figura 17: Espectro de absorção de luz visível das AgNPs à base de *C. longa* obtidas após 24 horas de síntese em diferentes temperaturas: 75°C; 50°C; 25°C e 0°C utilizando o EA fervido e filtrado (1 mg/mL) e AgNO₃ (1 mM). Legenda da foto: AgNPs obtidas a (1) 75°C; (2) 50°C; (3) 25°C e (4) 0°C.

5.1.1.3 Efeitos da concentração do EA na síntese de AgNPs

A quantidade de agentes redutores presentes no EA pode influenciar o rendimento da síntese e as características das AgNPs. Dessa forma, a síntese foi

realizada a 75°C durante 24 horas variando a concentração final de EA de *C. longa* a 0,25 / 0,5 / 1,0 e 2,0 mg/mL. A concentração final de AgNO₃ foi mantida a 1 mM.

Após o tempo de síntese, as características macroscópicas foram inicialmente avaliadas. Pode-se observar na foto ilustrada na figura 18 a diferença de coloração das amostras contendo diferentes concentrações de EA (0,25 / 0,5 / 1,0 e 2,0 mg/mL), passando de um amarelo a um marrom-alaranjado cada vez mais escuro. Portanto, visualmente já foi possível ressaltar que o aumento da concentração de EA mostrou um maior rendimento do processo de síntese.

A análise por espectrometria de luz visível confirmou essa primeira observação (Figura 18). O pico característico da RPS das AgNPs foi observado a 425 nm em todas as amostras contendo o sal precursor AgNO₃ a 1 mM com diferentes concentrações de EA. Entretanto, foi possível notar que, de acordo com o aumento da concentração de EA, os picos de RPS apresentaram absorbâncias maiores.

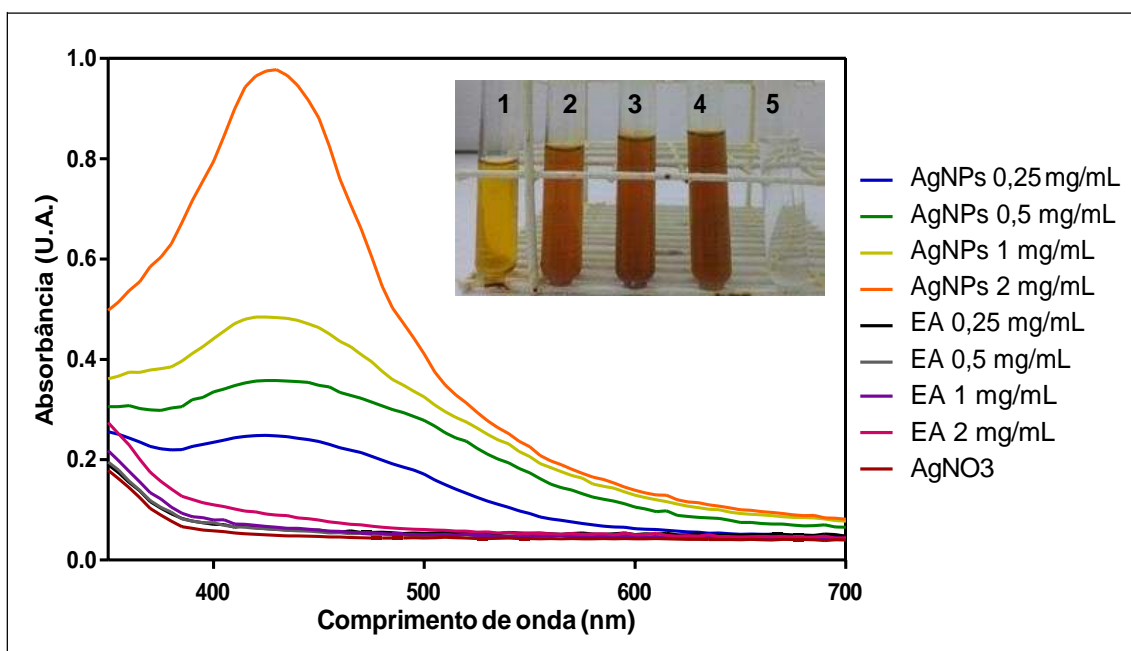


Figura 18: Espectro de absorção de luz visível das AgNPs obtidas após 24 horas de síntese a 75°C com diferentes concentrações de extrato aquoso (EA) de *C. longa*, mantendo fixa a concentração de AgNO₃ a 1 mM. Legenda da foto: AgNPs obtidas com (1) 0,25; (2) 0,5; (3) 1,0 e (4) 2,0 mg/mL de EA e (5) o controle AgNO₃.

Em termo de caracterização, as amostras sintetizadas com diferentes concentrações de EA de *C. longa* foram analisadas para a determinação do diâmetro hidrodinâmico em número, do *Z-average* (diâmetro hidrodinâmico médio em intensidade), do Pdl e do potencial Zeta. A distribuição de subpopulações de AgNPs em número está representada na figura 19. É possível observar que as AgNPs obtidas com 0,25 e 2,0 mg/mL de EA apresentaram uma população única de 105,7 e 141,8 nm, respectivamente. As AgNPs obtidas com 0,5 e 1 mg/mL de EA apresentaram duas subpopulações de diâmetro hidrodinâmico de 105,7 e 458,7 nm e 105,7 e 220,2 nm, respectivamente.

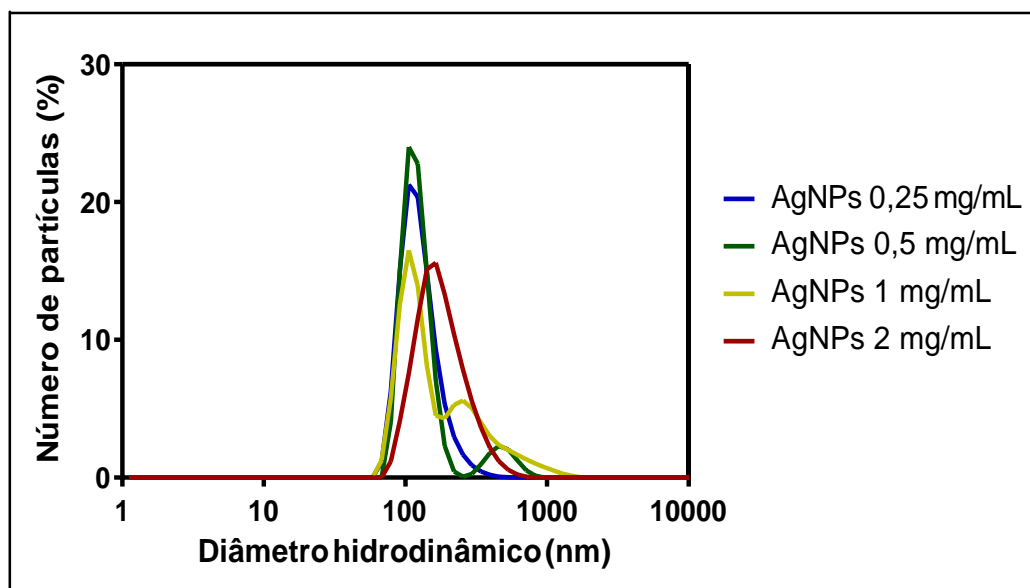


Figura 19: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das AgNPs obtidas a partir de concentrações diferentes de EA de *C. longa* (0,25 – 0,5 – 1,0 e 2,0 mg/mL).

As informações sobre *Z-average*, Pdl e potencial Zeta das AgNPs e dos controles dos extratos foram organizadas na tabela 4. Pode-se observar que as AgNPs obtidas com 0,25 e 2,0 mg/mL de EA apresentaram características similares entre si, e que o mesmo foi notado para as AgNPs obtidas com 0,5 e 1 mg/mL. Estas duas concentrações intermediárias de EA levaram à obtenção de estruturas maiores ($700,8 \pm 48,3$ e $750,6 \pm 42,5$ nm respectivamente) e polidispersas (Pdl de $0,658 \pm 0,038$ e $0,640 \pm 0,130$ respectivamente). Em comparação, as concentrações de 0,25 e 2,0 mg/mL de EA permitiram a formação de AgNPs menores ($212,9 \pm 4,5$ e $255,2 \pm 4,6$ nm respectivamente) e moderadamente homogêneas (Pdl de $0,257 \pm 0,063$ e $0,331 \pm 0,050$, respectivamente). As AgNPs obtidas com a concentração de 0,25 mg/mL de EA apresentaram uma boa estabilidade coloidal de acordo com o potencial Zeta de $-31,7$ mV. As AgNPs obtidas com as concentrações de 0,5 – 1 e 2 mg/mL de EA apresentaram uma moderada estabilidade coloidal (Tabela 4).

Tabela 4: Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*, nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas a partir de diferentes concentrações de EA de *C. longa*. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

	<i>Z-Ave (nm)</i>	<i>Pdl</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
AgNPs 0,25mg/mL	212,9 \pm 4,5	0,257 \pm 0,063	-31,7 \pm 0,8
AgNPs 0,5mg/mL	700,8 \pm 48,3	0,658 \pm 0,038	-29,3 \pm 0,2
AgNPs 1,0 mg/mL	750,6 \pm 42,5	0,640 \pm 0,130	-26,5 \pm 0,8
AgNPs 2,0 mg/mL	255,2 \pm 4,6	0,331 \pm 0,050	-26,7 \pm 0,5

5.1.1.4 Efeitos da concentração de nitrato de prata (AgNO₃)

A maioria dos estudos utilizam a concentração padrão de AgNO₃ de 1 mM. Entretanto, o resultado anterior (Figura 18) demonstrou que a síntese utilizando 0,25 mg/mL de EA não foi completa após 24 horas. Para avaliar o efeito da concentração de AgNO₃ na síntese de AgNPs foi realizada uma incubação a 75°C por 24 horas utilizando a concentração de EA a 0,25 mg/mL e variando a concentração de AgNO₃ para 0,25 / 0,5 e 1,0 mM.

Após o tempo de síntese, foi possível observar a diferença de coloração de cada solução contendo AgNPs (Figura 20). A redução da concentração de AgNO₃ de 1,0 – 0,5 e 0,25 mM está representada pelos tubos 1 – 2 e 3, respectivamente, onde pode-se observar uma diminuição de coloração. A análise por espectrometria de luz visível confirmou que a redução da concentração de AgNO₃ na solução reacional resultou em uma maior formação de AgNPs de acordo com o aumento da absorbância do pico de RPS.

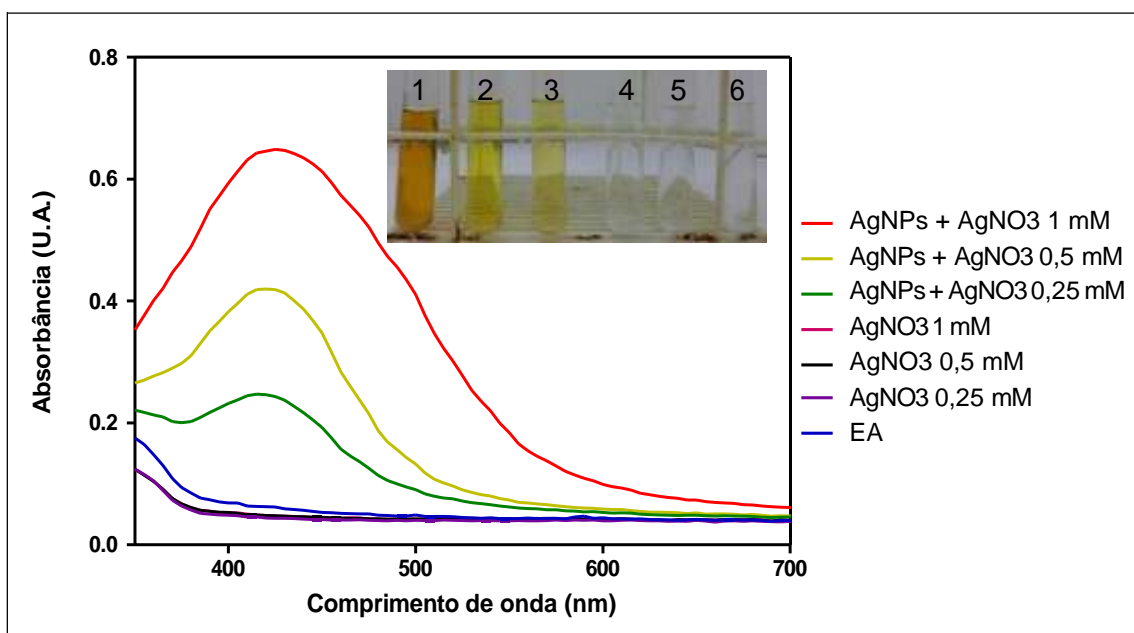


Figura 20: Espectro de absorção de luz visível das AgNPs obtidas a partir de 0,25 mg/mL de EA de *C. longa* e variando a concentração de AgNO_3 (1,0 – 0,5 e 0,25 mM). A síntese ocorreu a 75°C por 24 horas. Os controles AgNO_3 (1,0 – 0,5 e 0,25 mM) e EA foram representados. Legenda da foto: (1) AgNPs (AgNO_3 1 mM); (2) AgNPs (AgNO_3 0,5 mM); (3) AgNPs (AgNO_3 0,25 mM); (4) controle AgNO_3 1 mM; (5) controle AgNO_3 0,5 mM e (6) controle AgNO_3 0,25 mM.

Com relação às propriedades fisicoquímicas, as AgNPs obtidas a partir de AgNO_3 a 0,5 e 1,0 mM apresentaram uma única população de 24,36 e 91,28 nm, respectivamente, e as AgNPs obtidas a partir de AgNO_3 a 0,25 mM apresentaram duas subpopulações de 13,54 e 91,28 nm (Figura 21).

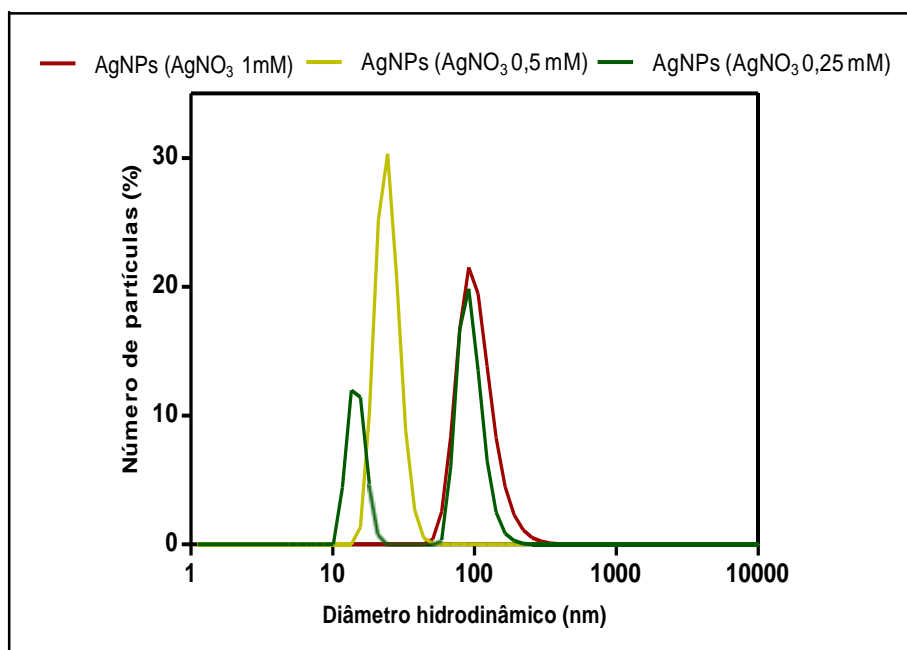


Figura 21: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das AgNPs obtidas a partir de 0,25 mg/mL de EA variando a concentração de AgNO_3 (1 – 0,5 e 0,25 mM). A síntese ocorreu a 75°C por 24 horas.

A tabela 5 agrupa os dados de *Z-average*, Pdl e potencial Zeta das AgNPs obtidas com as diferentes concentrações de AgNO_3 assim como o controle do extrato. Pode-se observar que as AgNPs obtidas com 1 mM de AgNO_3 apresentaram características mais interessantes como um *Z-average* e um Pdl menores ($180,5 \pm 2,8$ e $0,294 \pm 0,046$, respectivamente) e uma maior estabilidade coloidal de acordo com o valor do potencial Zeta de $-32,8 \pm 0,3$ mV. O valor do *Z-average* das AgNPs tende a reduzir de acordo com o aumento da concentração de AgNO_3 . Entretanto, os valores do Pdl e do potencial Zeta não parecem ser associados à diferença de concentração de AgNO_3 (Tabela 5).

Tabela 5: Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*, nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO₃ (0,25 – 0,5 e 1 mM). Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

	<i>Z-Ave (d-nm)</i>	<i>Pdl</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
AgNPs (AgNO₃ 1,0 mM)	180,5 ± 2,8	0,294 ± 0,046	-32,8 ± 0,3
AgNPs (AgNO₃ 0,5 mM)	192,7 ± 56,6	0,403 ± 0,057	-21,1 ± 2,3
AgNPs (AgNO₃ 0,25 mM)	208,1 ± 35,7	0,394 ± 0,033	-29,8 ± 0,8

5.1.1.5 Efeitos da temperatura de armazenamento da *C. longa* na síntese de AgNPs

O material primário de *C. longa* (tubérculo seco em pó) foi armazenado a temperatura ambiente (TA) e a -20 °C protegido da luz para determinar a condição mais adequada para preservar as características redutoras dos componentes da amostra. A síntese de AgNPs foi realizada por 24 horas a 75°C após 30 dias de armazenamento em cada uma das condições utilizando 1 mg/mL de EA e 1 mM de AgNO₃.

Pode-se observar na figura 22 (foto) uma pequena diferença de coloração entre o frasco (1) (amarelo) e o frasco (3) (marrom-alaranjado), representando as AgNPs obtidas a partir da *C. longa* armazenada a -20 °C e a TA, respectivamente. O espectro de absorção apresentou um pico característico de RPS a 425 nm de menor intensidade para as AgNPs obtidas a partir de *C. longa* previamente congelada (Figura 22).

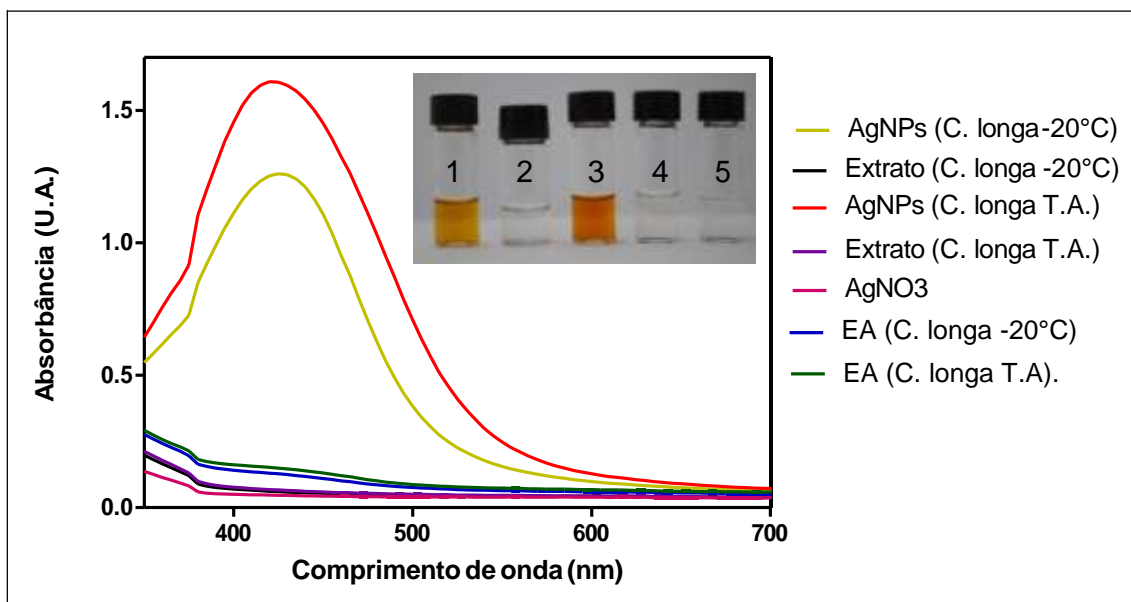


Figura 22: Espectro de absorção de luz visível representando a RPS de AgNPs sintetizadas por 24 horas a 75 °C a partir de pó de *C. longa* armazenado a -20°C ou a temperatura ambiente (T.A.). Os controles da síntese como extrato e AgNO₃, assim como os EA obtidos a partir de *C. longa* a -20°C e TA foram analisados. Legenda da foto: (1) AgNPs (*C. longa* -20°C); (2) *C. longa* -20°C; (3) AgNPs (*C. longa* T.A.); (4) *C. longa* T.A. e (5) Controle AgNO₃.

5.1.1.6 Efeitos da presença de ar atmosférico

A síntese de AgNPs foi realizada a 75°C por 24 horas a partir de 1 mg/mL de EA e 1 mM de AgNO₃. Pode-se observar que o pico referente à RPS das AgNPs foi de maior intensidade na síntese que foi realizada em tubo de ensaio onde há presença de ar atmosférico. Em contrapartida, a síntese de AgNPs que ocorreu em frasco reator, hermeticamente fechado, apresentou um pico de absorbância menor (Figura 23). Portanto, a presença de ar atmosférico é primordial para que ocorra a formação de AgNPs.

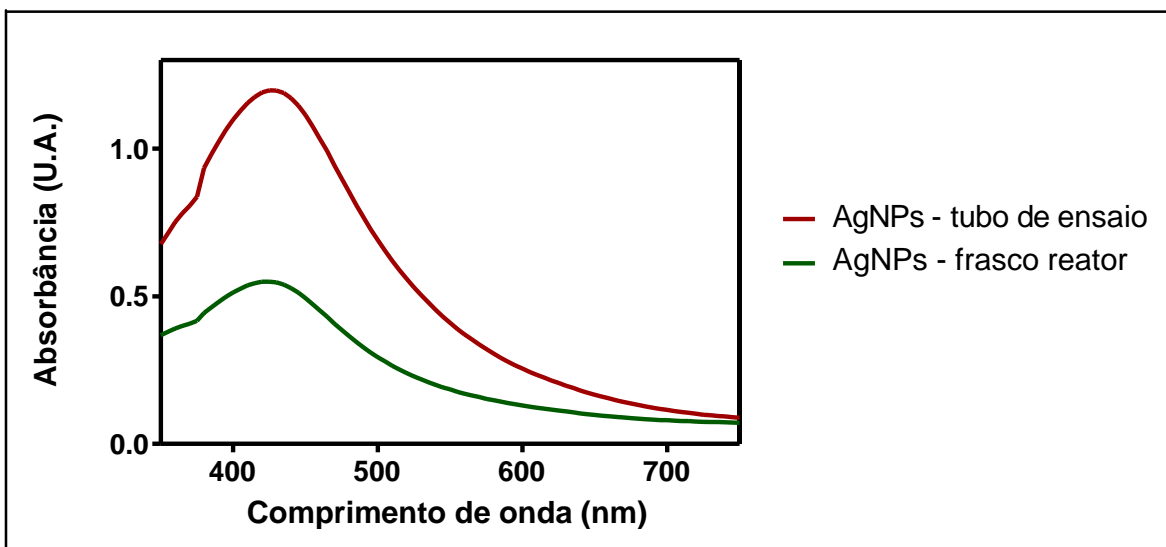


Figura 23: Espectro de absorção de luz visível representando a FRP de AgNPs sintetizadas por 24 horas a 75°C em tubo de ensaio (com presença de ar atmosférico) e em frasco reator (sem presença de ar atmosférico).

Em termo de características, o Pdl foi a medida que diferenciou mais as duas amostras. De fato, as AgNPs sintetizadas em frasco reator apresentaram um Pdl muito elevado ($0,883 \pm 0,126$) em comparação com as AgNPs obtidas na presença de ar atmosférico ($0,331 \pm 0,050$). O valor do potencial Zeta não mudou de maneira expressiva entre as AgNPs. Entretanto, as AgNPs apresentaram um diâmetro hidrodinâmico menor quando a síntese ocorreu na presença de ar atmosférico (Tabela 6).

Tabela 6: Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*, nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas em tubos de ensaio (presença de ar atmosférico) e em frasco reator (sem presença de ar atmosférico). Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

	<i>Z-average</i> (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
AgNPs – tubo de ensaio	$76,3 \pm 11,7$	$0,331 \pm 0,050$	$-29,8 \pm 3,3$
AgNPs – frasco reator	$104,7 \pm 13,1$	$0,883 \pm 0,136$	$-33,2 \pm 2,3$

Em suma, a investigação da influência dos fatores listados acima (itens 4.1.1.1 a 4.1.1.6) na formulação de AgNPs a partir de EA de *C. longa* permitiu determinar quais seriam as condições mais adequadas para a otimização do rendimento da síntese. Portanto, as AgNPs empregadas nos experimentos a seguir foram obtidas a partir da utilização de tubérculo de *C. longa* armazenado a TA, o EA fervido e filtrado, EA na concentração de 2 mg/mL e AgNO₃ a 1 mM por 24 horas a 75°C na presença de ar atmosférico.

5.1.2 Cinética da síntese de AgNPs

A cinética da síntese de AgNPs foi monitorada durante 48 horas a 75°C com EA a 2 mg/mL e AgNO₃ a 1 mM (Figura 24A). Pode-se observar que a síntese ocorreu de forma lenta durante as primeiras 9 horas e em seguida, acelerou para estabilizar aproximadamente 22 horas após seu início. O monitoramento da síntese após 24 horas não demonstrou um aumento expressivo da absorbância. Os controles de AgNO₃ e do EA não resultaram em aumento da absorbância.

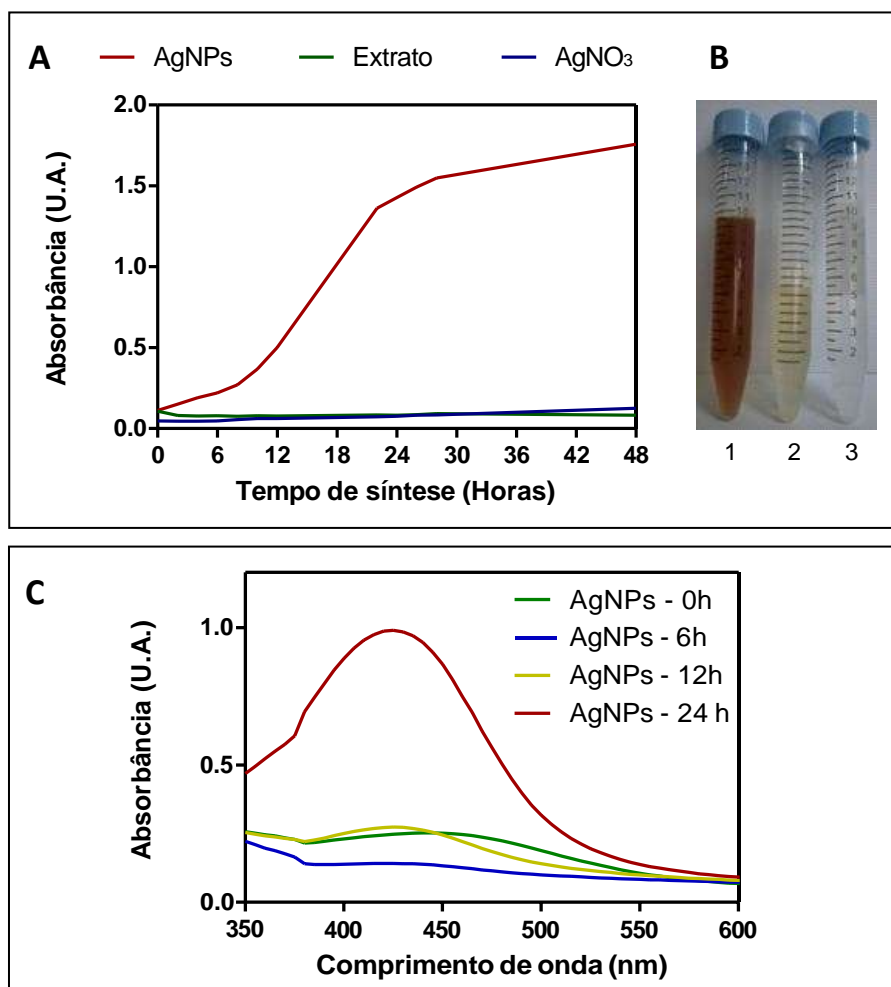


Figura 24: Curva de cinética da síntese de AgNPs utilizando extrato aquoso filtrado de *C. longa* (2,0 mg/mL) e AgNO₃ (1mM) a 75°C durante 48 horas (A). Foto: 1- AgNPs; 2- Extrato e 3- AgNO₃ após 24 horas de síntese (B). Espectro de absorção de AgNPs após 0, 6, 12 e 24 horas de síntese a 75°C representando a frequência de ressonância plasmônica a 425 nm das AgNPs (C).

No presente trabalho, a análise em ampla faixa de comprimentos de onda (350 – 600 nm) por espectrofotometria de luz visível foi realizada após 0, 6, 12 e 24 horas da síntese (Figura 24C). É possível observar um pico de absorbância a 425 nm característica da presença de AgNPs em suspensão apenas no tempo de 24 horas. Adicionalmente, após 24 horas, as AgNPs obtidas apresentaram propriedades ópticas características da formação de AgNPs mostrando mudança de coloração da solução reacional que passou de um amarelo claro (cor do extrato) para um marrom-

alaranjado (Figura 24B). De acordo com os dados apresentados na figura 24, a síntese das AgNPs obtidas ocorreu de forma lenta e gradual, sugerindo a formação de estruturas mais homogêneas e estáveis. Para avaliar tais características, análises de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial Zeta e morfologia das AgNPs à base de *C. longa* foram realizadas e apresentadas a seguir.

As AgNPs foram submetidas aos processos de secagem por liofilização ou centrifugação (tipo Speed-vac®) para determinar se as amostras mantêm as suas propriedades físicoquímicas iniciais. Contudo, após serem ressuspensas em água ultrapura, as AgNPs não preservaram as suas características iniciais. Os valores de diâmetro hidrodinâmico e de PDI aumentaram. O potencial Zeta manteve-se estável (Tabela 7).

Tabela 7: Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*, nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV) das AgNPs secas por liofilização ou centrifugação (tipo Speed-vac®) e ressuspensas em água ultra pura.

	Z-AVE (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)
AgNPs iniciais	210,3 ± 57,1	0,319 ± 0,043	-24,8 ± 2,2
AgNPs secas por liofilização	722,8 ± 43,8	0,680 ± 0,050	-21,1 ± 4,7
AgNPs secas por centrifugação tipo Speed vac®	1862,0 ± 548,5	1,0 ± 0	-28,0 ± 3,3

5.1.3 Associação das AgNPs à quitosana

Após o processo de otimização dos parâmetros de síntese, as AgNPs obtidas e caracterizadas foram misturadas a uma solução aquosa de quitosana de baixa massa molecular para formar as AgNPs associadas à quitosana (CH-AgNPs). O espectro de absorvância das amostras está representado na figura 25. É possível detectar o pico

correspondente à RPS da prata reduzida na amostra CH-AgNPs (Figura 25), mas em menor intensidade de que as AgNPs livres. Este fato está associado à diluição das AgNPs na solução de quitosana. As demais amostras controle não apresentaram pico de absorbância.

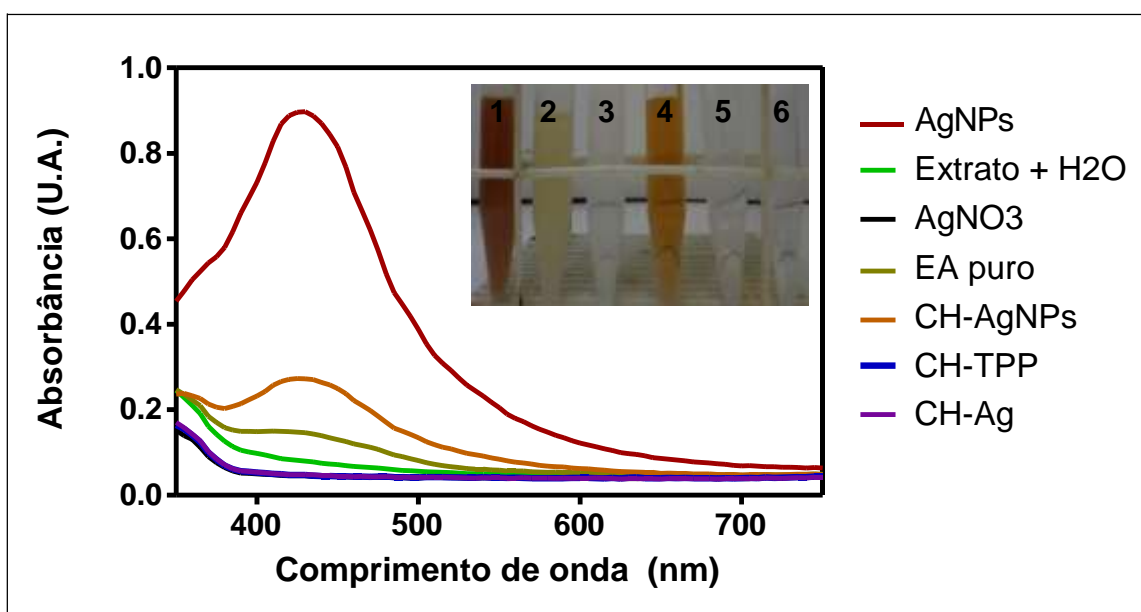


Figura 25: Espectro de absorção de luz visível representando a FRP de AgNPs sintetizadas a partir de 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃ por 24 horas a 75 °C e utilizadas para a formação de CH-AgNPs. As demais amostras não apresentaram pico de FRP. Legenda da foto: (1) AgNPs; (2) Extrato de *C. longa*; (3) AgNO₃; (4) CH-AgNPs; (5) CH-TPP e (6) CH-AgNO₃.

Ao longo do estudo, as AgNPs e as CH-AgNPs foram analisadas por DLS-Zeta para determinar o diâmetro hidrodinâmico, o Pdl e o potencial Zeta. O diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e das CH-AgNPs foram representados em distribuição de classe em número, intensidade e volume (Figura 26). As AgNPs apresentaram uma população unimodal na distribuição de classe em número e em intensidade de 105,7 e 190,1 nm, respectivamente (Figura 26A). As CH-AgNPs tendem a apresentar duas populações de 78,8 ± 9,7 e 122,4 ± 8,6 nm com a curva em número e uma única população de 295,3 ± 9,5 nm com a curva em intensidade (Figura 26B).

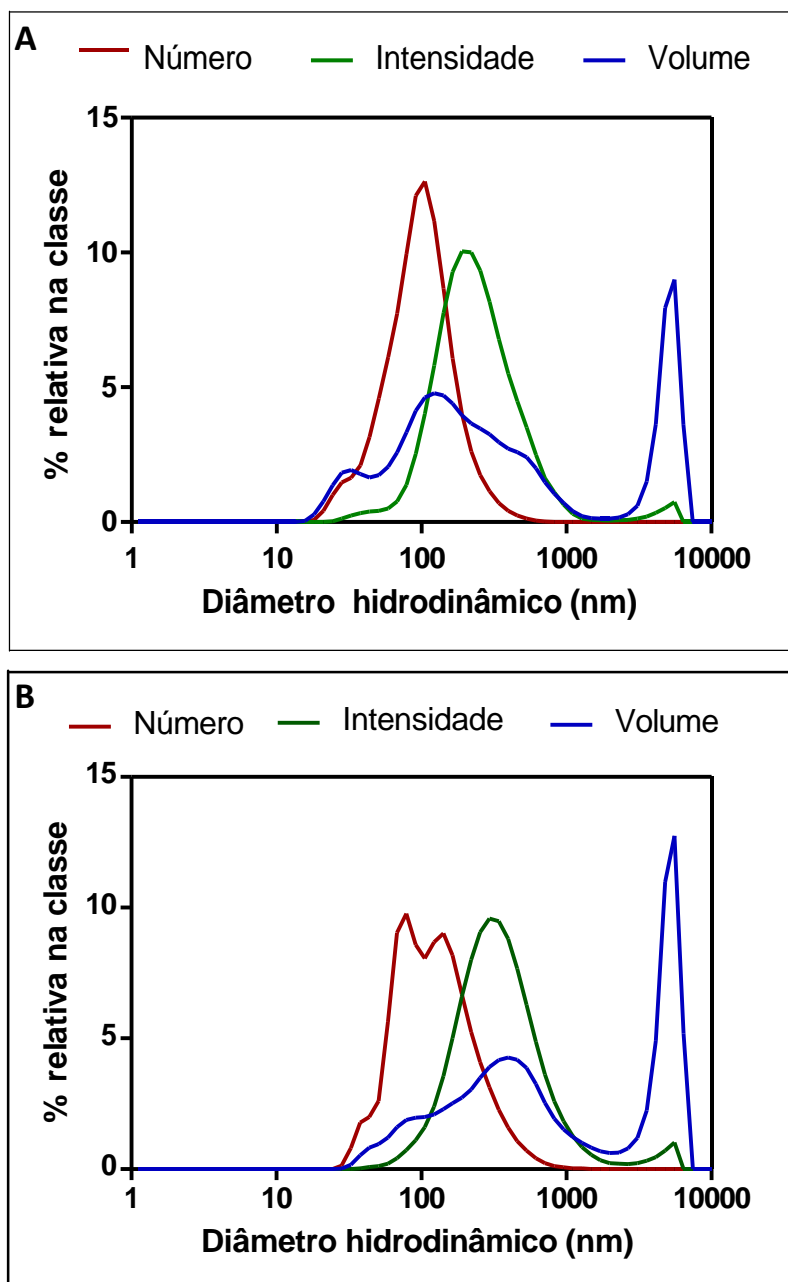


Figura 26: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, intensidade e volume das AgNPs obtidas a partir de 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃ (**A**) e das CH-AgNPs (**B**). A síntese ocorreu a 75°C por 24 horas.

A tabela 8 reagrupa as características das AgNPs e CH-AgNPs obtidas por DLS-Zeta. O *Z-average* das partículas aumentou com a presença da quitosana de $210,3 \pm 57,1$ para $328,0 \pm 61,6$ nm. Os valores de Pdl se mantiveram parecidos, representando

uma homogeneidade moderada. As AgNPs foram carregadas negativamente. Contudo, a presença da quitosana tornou a superfície das partículas positiva devido ao caráter catiônico.

Tabela 8: Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*, nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs e CH-AgNPs. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

	Z-average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mv)
AgNPs	210,3 \pm 57,1	0,319 \pm 0,043	-24,8 \pm 2,2
CH-AgNPs	328,0 \pm 61,6	0,372 \pm 0,059	53,9 \pm 3,1

Os controles da síntese de CH-AgNPs, as nanopartículas de quitosana livres (CH-TPP) e quitosana com AgNO₃ (CH-AgNO₃), também foram analisados por DLS-Zeta. As curvas de distribuição de classe dessas amostras foram representadas em número, intensidade e volume (Figura 27). Essas curvas representam a média de todos os dados obtidos por DLS-Zeta ao longo deste trabalho.

As CH-TPP apresentaram uma distribuição bimodal de 37,84 \pm 8,1 e 91,28 \pm 10,3 nm de acordo com a curva em número e uma população de 220,2 \pm 10,1 nm segundo a curva em intensidade (Figura 27A). O controle CH-AgNO₃ foi ilustrado por uma única população de 91,2 \pm 11,2 nm e de 220,2 \pm 9,8 nm nas distribuições em número e intensidade, respectivamente (Figura 27B).

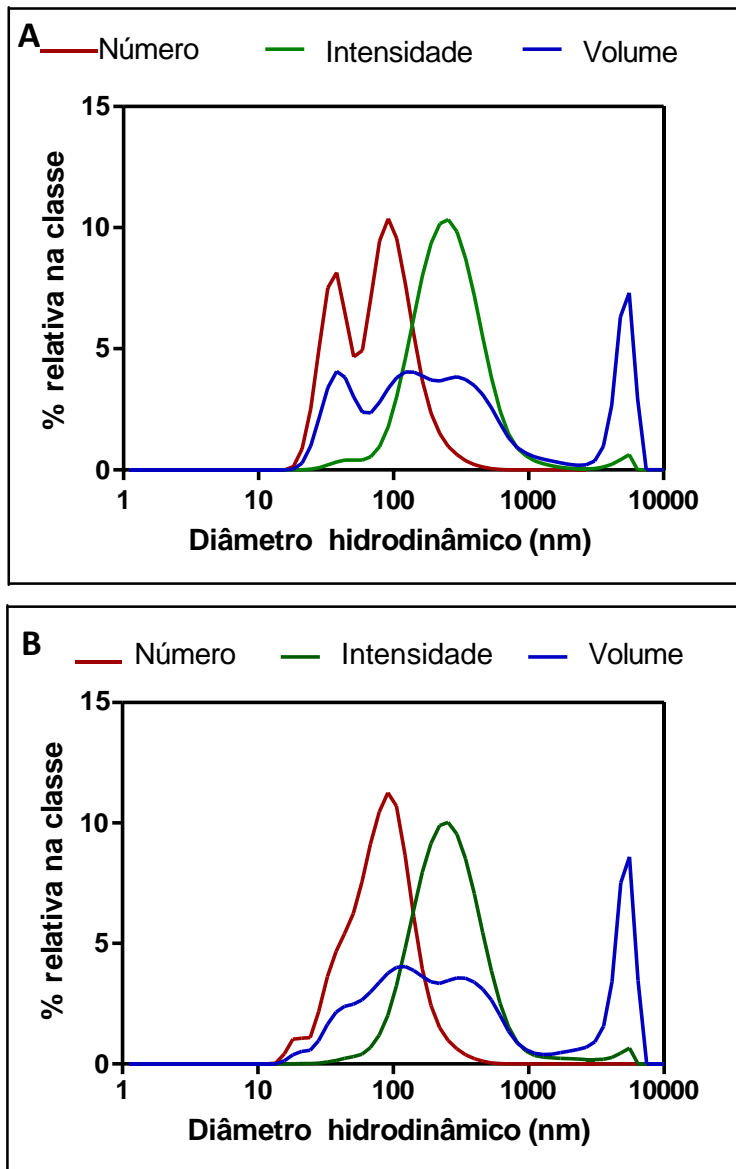


Figura 27: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número, intensidade e volume de CH-TPP (A) e CH-AgNO₃ (B).

As CH-TPP e as CH-AgNO₃ apresentaram características similares entre si (Tabela 9).

Tabela 9: Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*, nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV) das AgNPs e CH-AgNPs. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

	Z-average (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
CH-TPP	215,1 \pm 12,9	0,327 \pm 0,062	51,9 \pm 2,6
CH-AgNO₃	219,1 \pm 31,0	0,361 \pm 0,062	52,8 \pm 2,1

5.1.4 Aspectos topográficos e morfométricos das AgNPs e das CH-AgNPs

A técnica de MFA é frequentemente utilizada para determinar as características topográficas de superfícies de NPMs secas. O seu uso é favorecido pelo fato de apresentar um preparo rápido das amostras e uma aquisição das imagens dispensada de aplicação de vácuo. As AgNPs diluídas em água ultrapura (1:10, v/v) foram analisadas em modo dinâmico-fase. A imagem representativa das AgNPs secas (Figura 28A) mostrou uma população homogênea de partículas amorfas de $23,22 \pm 9,78$ nm de altura média (Figura 27B). O diâmetro seco e o formato das CH-AgNPs foram avaliados por MFA. As CH-AgNPs foram diluídas em água ultrapura (1:20, v/v) para poder observar estruturas isoladas. Entretanto, as estruturas analisadas na figura 27 apresentam um tamanho em altura menor (inferior a 10 nm) em comparação com o tamanho das AgNPs de $23,22 \pm 9,78$ nm de altura analisadas pelo mesmo método (Figura 28A). A imagem ilustrada na figura 28 apresenta, provavelmente, apenas a quitosana livre e nanoestruturada sem AgNPs devido ao tamanho observado. Não foi possível observar as AgNPs devido à diluição da amostra necessária para ver as nanoestruturas isoladas.

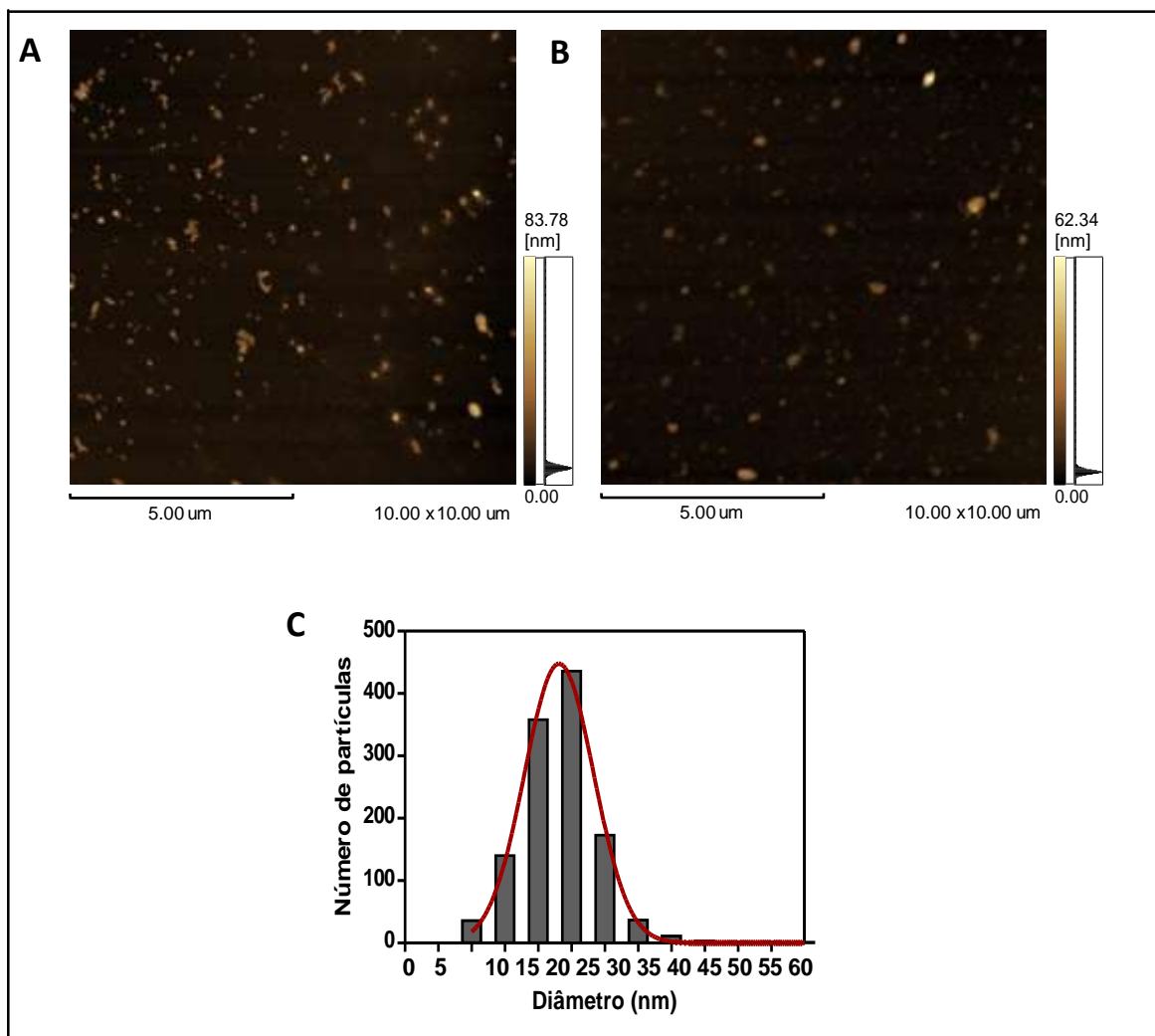


Figura 28: Imagem topográfica obtida por microscopia de força atômica (MFA) em modo fase das AgNPs sintetizadas a partir de 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃ (A) e das CH-AgNPs a base de *C. longa* diluídas em água ultrapura (1:20, v/v) (B). Diagrama de faixa de distribuição de tamanho das AgNPs (C) observadas por MFA.

A técnica de MET é amplamente empregada na literatura para determinar o diâmetro seco e o formato de nanoestruturas. As AgNPs foram preparadas de forma simples e rápida, em uma única etapa de diluição em água ultrapura (1:10, v/v). A partir da figura 29A, é possível observar uma população homogênea de AgNPs esféricas com diâmetro médio de $18,78 \pm 5,50$ nm. Os dados observados na análise por MFA para as amostras de CH-AgNPs foram confirmados pelas imagens obtidas pelo MET. As imagens obtidas estão representadas nas figuras 29C e 29D onde é possível

observar poucas AgNPs e várias nanoestruturas de quitosana sem AgNPs. Pode-se notar uma eletrodensidade maior ao redor destas AgNPs, sugerindo que a quitosana (catiônica) pode estar recobrando as AgNPs negativamente carregadas.

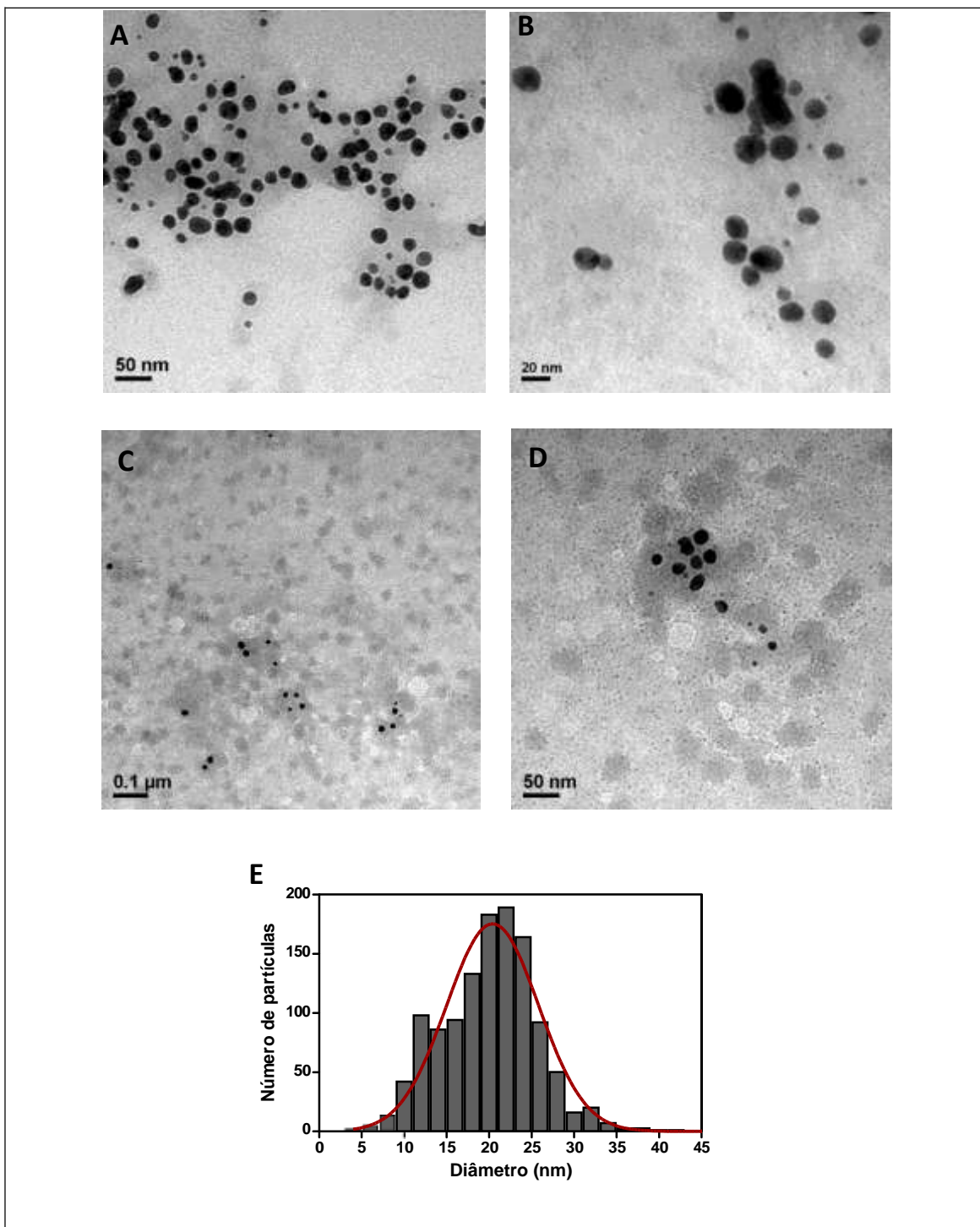


Figura 29: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas a partir de 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO_3 no aumento de 250 kV (A) e 500 kV (B) e imagens das CH-AgNPs obtidas a partir das AgNPs no aumento de 120 kV (C) e 250 kV (D). Diagrama de frequência dos diâmetros das AgNPs observadas por MET (E).

As imagens de CH-TPP e CH-AgNO₃ obtidas pelo MET apresentaram estruturas esféricas de aproximadamente 20 nm (Figura 30). Essas estruturas foram semelhantes às estruturas observadas na amostra CH-AgNPs, com exceção das AgNPs livres (Figura 30A – seta amarela e 30B). Pode-se observar que há presença de material livre correspondendo, provavelmente, à quitosana que não foi nanoestruturada (Figura 30A – seta vermelha e 30B).

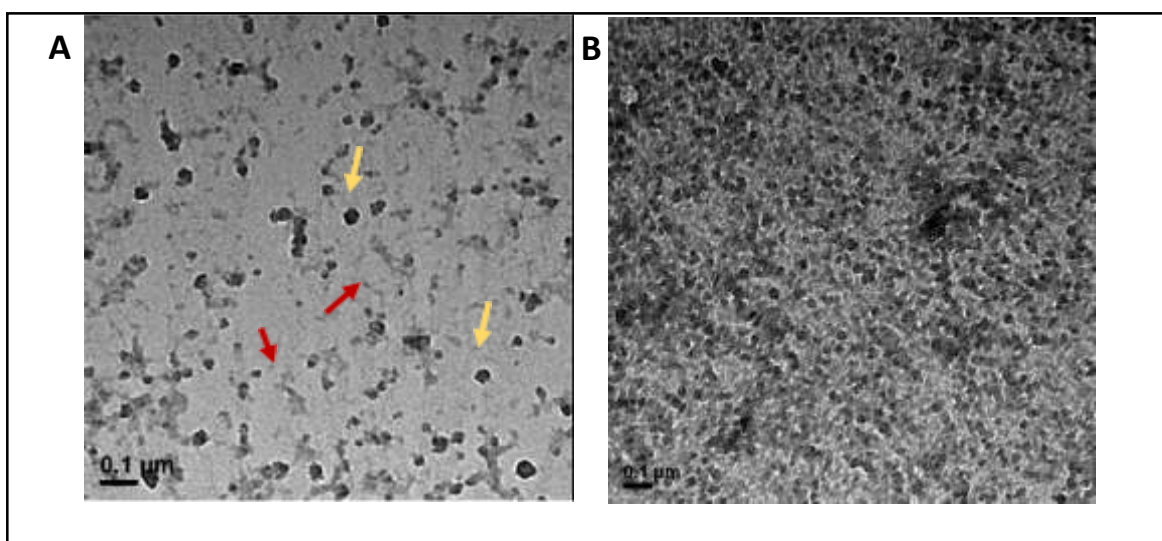


Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de CH-TPP no aumento de 100 kV (A) e CH-AgNO₃ no aumento de 80 kV (B).

5.2 ESTABILIDADE DAS NANOESTRUTURAS

As AgNPs, CH-AgNPs e CH-TPP obtidas após síntese foram armazenadas a 4°C e a temperatura ambiente (TA), protegidas da luz. A estabilidade dessas amostras foi avaliada por DLS-Zeta, registrando o diâmetro hidrodinâmico em número, o *Z-average*, o PDI e o potencial Zeta, em intervalos ao longo de 30 dias. Inicialmente, as amostras foram armazenadas também a -20°C. Entretanto, foi observado que as estruturas precipitaram e não mantiveram suas características iniciais nesta condição (dados não

mostrados). Todos os resultados de estabilidade a seguir representam uma compilação do todas as sínteses realizadas.

5.2.1 AgNPs

As AgNPs armazenadas a 4°C apresentaram uma população de 105,7 nm no dia 1 e uma população de 91,28 nm após 7, 15 e 30 dias. Observando os dados da distribuição em número na figura 31A, é possível detectar a tendência de formação de uma segunda subpopulação de 28,21 nm após 7 dias. Contudo, a presença de outra subpopulação de 50,75 nm e 43,82 nm foi evidente após 15 e 30 dias, respectivamente. As AgNPs mantidas a TA apresentaram uma população de 105,7 nm no dia 1 e após 7 e 30 dias. Após 15 dias, a única população existente tende a se dividir em duas subpopulações de 78,82 e 122,4 nm (Figura 31B).

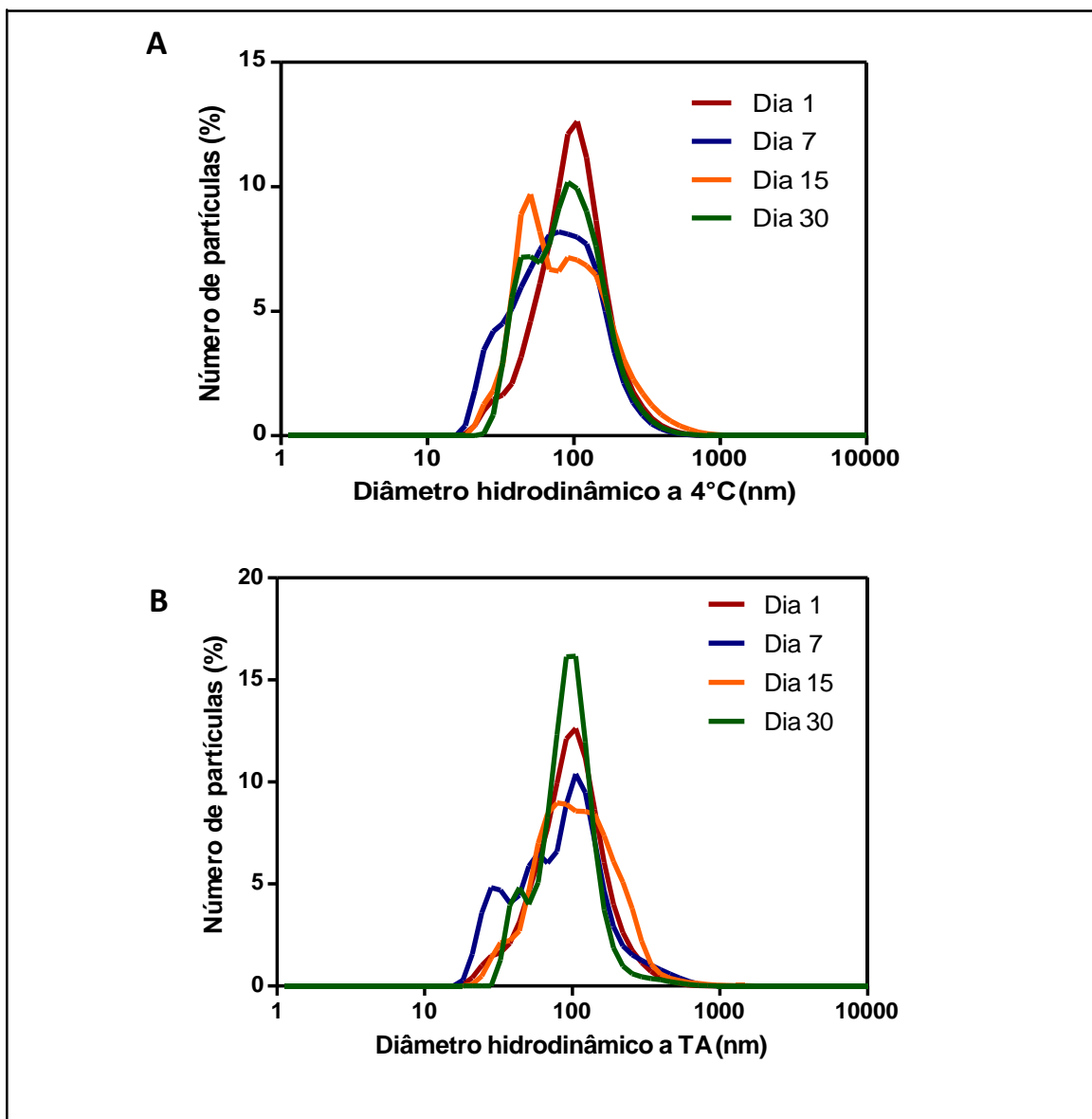


Figura 31: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das AgNPs obtidas a partir de 2 mg/mL de EA 1 mM de AgNO₃ de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C (A) e T.A. (B).

Os valores de *Z-average*, Pdl e potencial Zeta das AgNPs armazenadas a 4°C não apresentaram diferença significativa após os 30 dias de monitoramento. Contudo, é possível observar um discreto aumento do valor do *Z-average* ao longo do tempo que passou de $210,3 \pm 57,1$ (Dia 1) a $268,9 \pm 54,8$ nm após 30 dias (Figura 31A). O Pdl permaneceu estável com os valores de $0,319 \pm 0,043$ no dia 0; $0,138 \pm 0,056$ após 7 dias; $0,319 \pm 0,057$ após 15 dias e $0,403 \pm 0,056$ após 30 dias. As AgNPs a 4°C

apresentaram um potencial Zeta estável de $-23,98 \pm 2,3$ no dia 0; $-23,7 \pm 1,9$ após 7 dias; $-23,1 \pm 2,4$ após 15 dias e $-22,4 \pm 4,6$ após 30 dias (Figura 32A).

As AgNPs armazenadas à TA não possuíram uma estabilidade similar à das AgNPs guardadas a 4°C. De fato, apesar de apresentar uma boa estabilidade do diâmetro hidrodinâmico em número (Figura 31B), as estruturas demonstraram um aumento significativo do *Z-average* e do Pdl ao longo dos dias (Figura 32B). Os valores de *Z-average* passaram de $210,3 \pm 57,1$ a $488,6 \pm 57,6$ nm após 1 e 30 dias, respectivamente. O aumento está provavelmente associado à agregação das próprias AgNPs ou à agregação de material do extrato e/ou íons livres. Os valores de Pdl, consequentemente, aumentaram também de $0,319 \pm 0,043$ a $0,681 \pm 0,069$ após 1 e 30 dias (Figura 32B). Contudo, as AgNPs mantiveram valores de potencial Zeta estáveis de $-23,9 \pm 2,3$ e $-25,6 \pm 4,3$ mV, respectivamente (Figura 33).

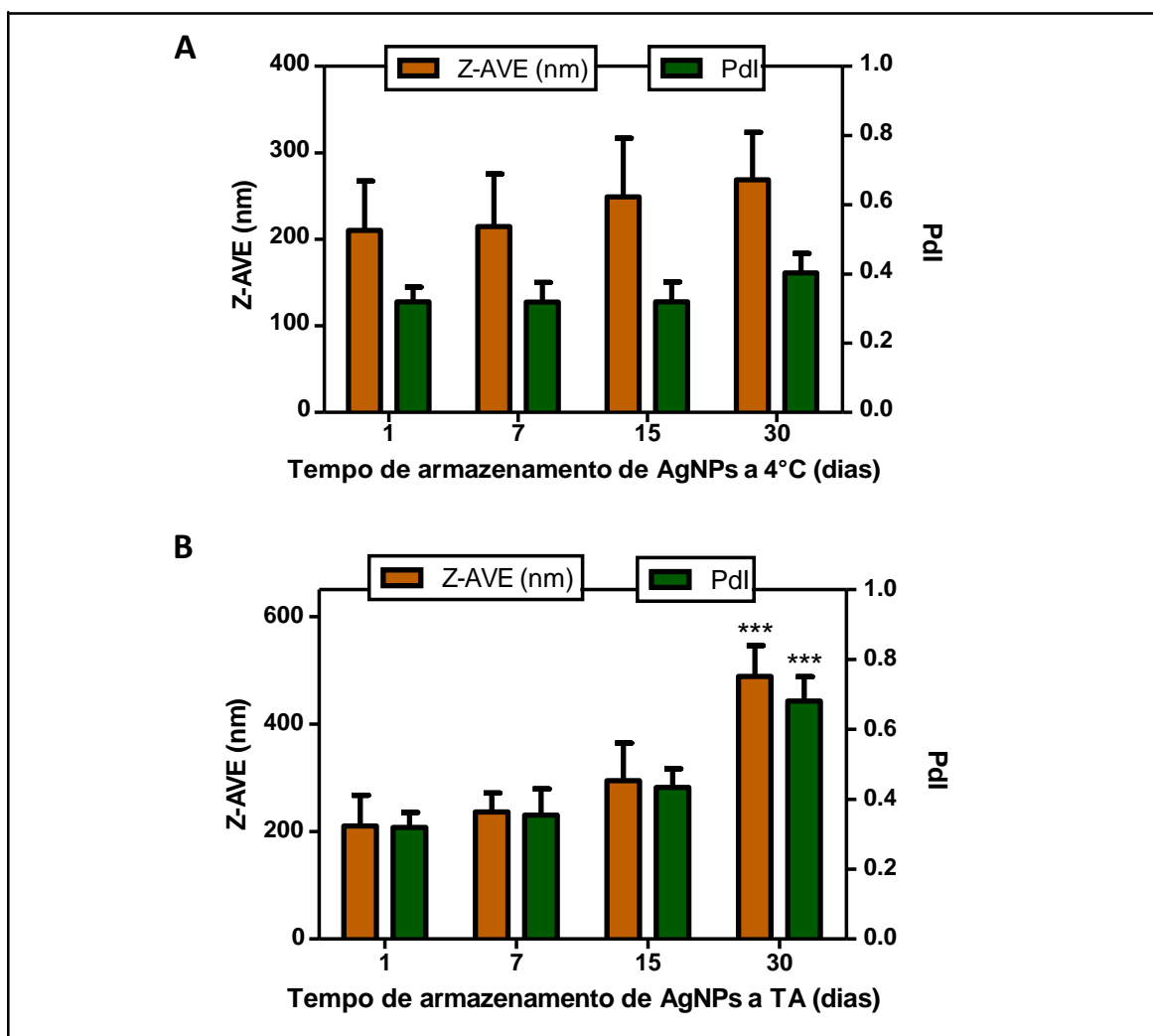


Figura 32: Gráfico representando da distribuição de Z-Average (nm) (nm) e índice de polidispersão (Pdl) das AgNPs obtidas a partir de 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃ de acordo com o tempo de armazenamento (1– 7 – 15 e 30 dias) a 4°C (A) e T.A. (B). Teste ANOVA e post test Bonferroni, *** diferença significativa de Z-average e Pdl do dia 30 em comparação com o dia 1 (P < 0,0001).

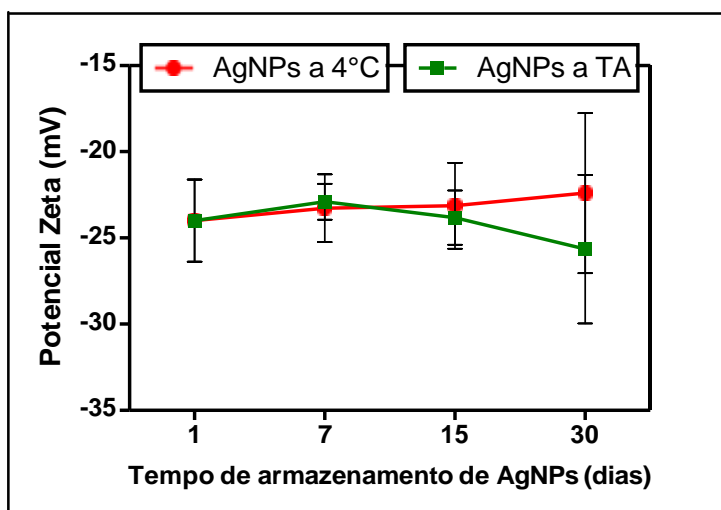


Figura 33: Potencial Zeta (mV) das AgNPs obtidas a partir de 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO_3 de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C e T.A.

5.2.2 CH-AgNPs

Não houve diferença significativa nos valores de *Z-average*, Pdl e potencial Zeta das CH-AgNPs armazenadas a 4°C e TA (Figuras 34 – 36). Os valores de *Z-average* das CH-AgNPs a 4°C e TA variaram de $328,0 \pm 61,6$ a $346,1 \pm 32,2$ nm e $328,0 \pm 61,6$ a $253,8 \pm 80,8$ nm após dia 1 e 30, respectivamente. É possível detectar uma discreta diminuição do *Z-average* das CH-AgNPs a TA após 30 dias. As CH-AgNPs apresentaram um potencial Zeta estável ao longo dos dias nas duas condições de armazenamento (Figura 36).

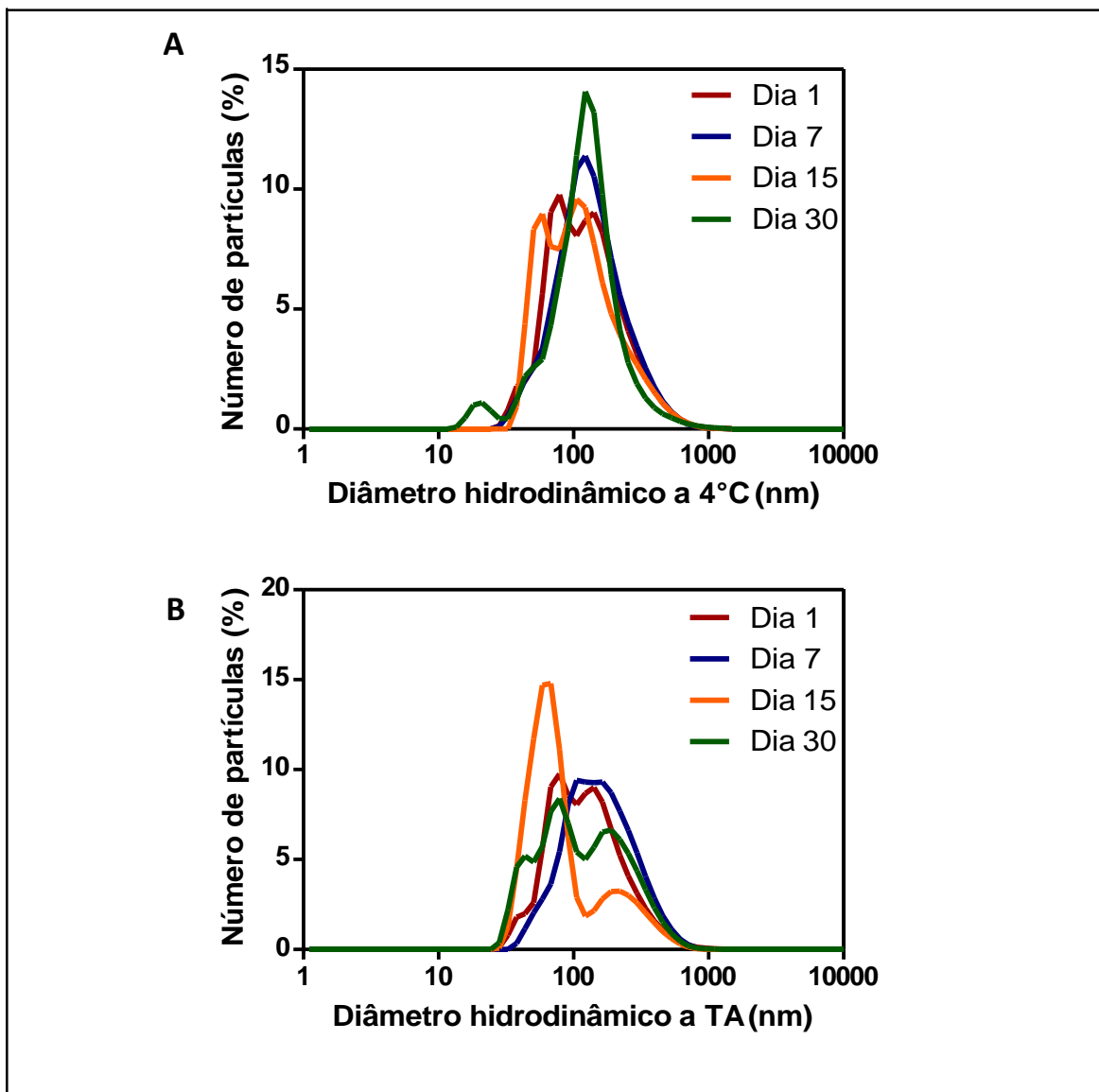


Figura 34: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das CH-AgNPs obtidas a partir das AgNPs livres e solução de quitosana de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C (A) e T.A. (B).

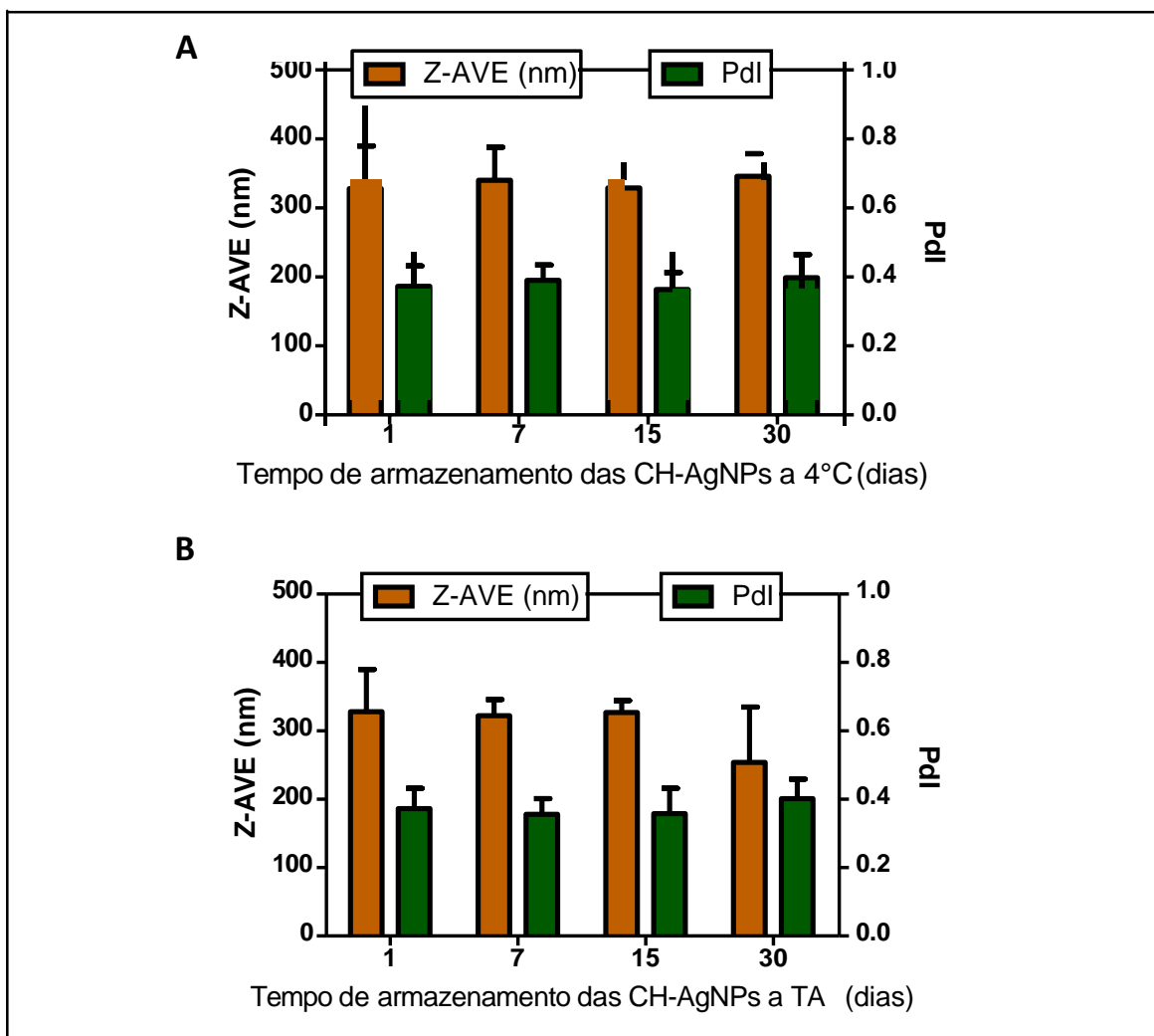


Figura 35: Gráfico representando a distribuição de Z-Average (nm) e Pdl das CH-AgNPs obtidas a partir de AgNPs sintetizadas com 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃ de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C (A) e T.A. (B).

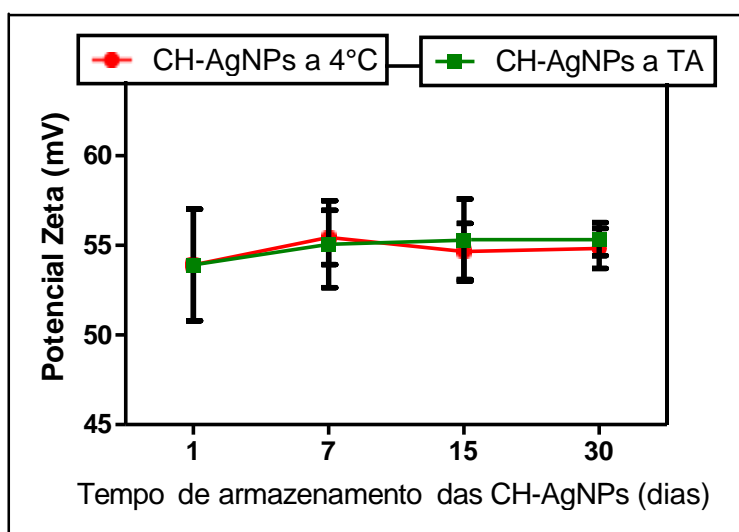


Figura 36: Potencial Zeta (mV) das CH-AgNPs obtidas a partir de AgNPs sintetizadas com 2 mg/mL de EA de *C. longa* e 1 mM de AgNO₃ de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C e T.A.

5.2.3 CH-TPP

As CH-TPP a 4°C e TA apresentaram uma evolução similar do diâmetro hidrodinâmico ilustrado na figura 37. Contudo, o fenômeno parece ser mais claro quando as amostras são armazenadas a 4°C. Pode-se observar que nos dias 1 – 7 e 15, as CH-TPP demonstraram duas populações de aproximadamente $37,8 \pm 8,1$ e $105,7 \pm 14,6$ nm. Após o dia 30, a distribuição se tornou unimodal, e apenas uma população de $78,8 \pm 14,4$ nm foi observada (Figura 37A). A mesma tendência ocorreu para as CH-TPP armazenadas a TA. Entretanto, a amostra apresentou a presença de 4 subpopulações após 15 dias de armazenamento a TA, e foi possível observar um pico mais largo no dia 30, sugerindo a formação de uma nova população de partículas em comparação com a amostra armazenada a 4°C (Figura 37B).

Ao observar a figura 37, pode-se observar que as CH-TPP foram estáveis a 4°C e não apresentaram diferença significativa entre os tempos de análises (Figura 38A). Em comparação, as CH-TPP armazenadas a TA apresentaram um aumento significativo do tamanho após 30 dias (Figura 38B). O Pdl e o potencial Zeta não sofreu alteração ao longo do tempo de monitoramento em nenhuma das duas condições de armazenamento (Figuras 38 – 39).

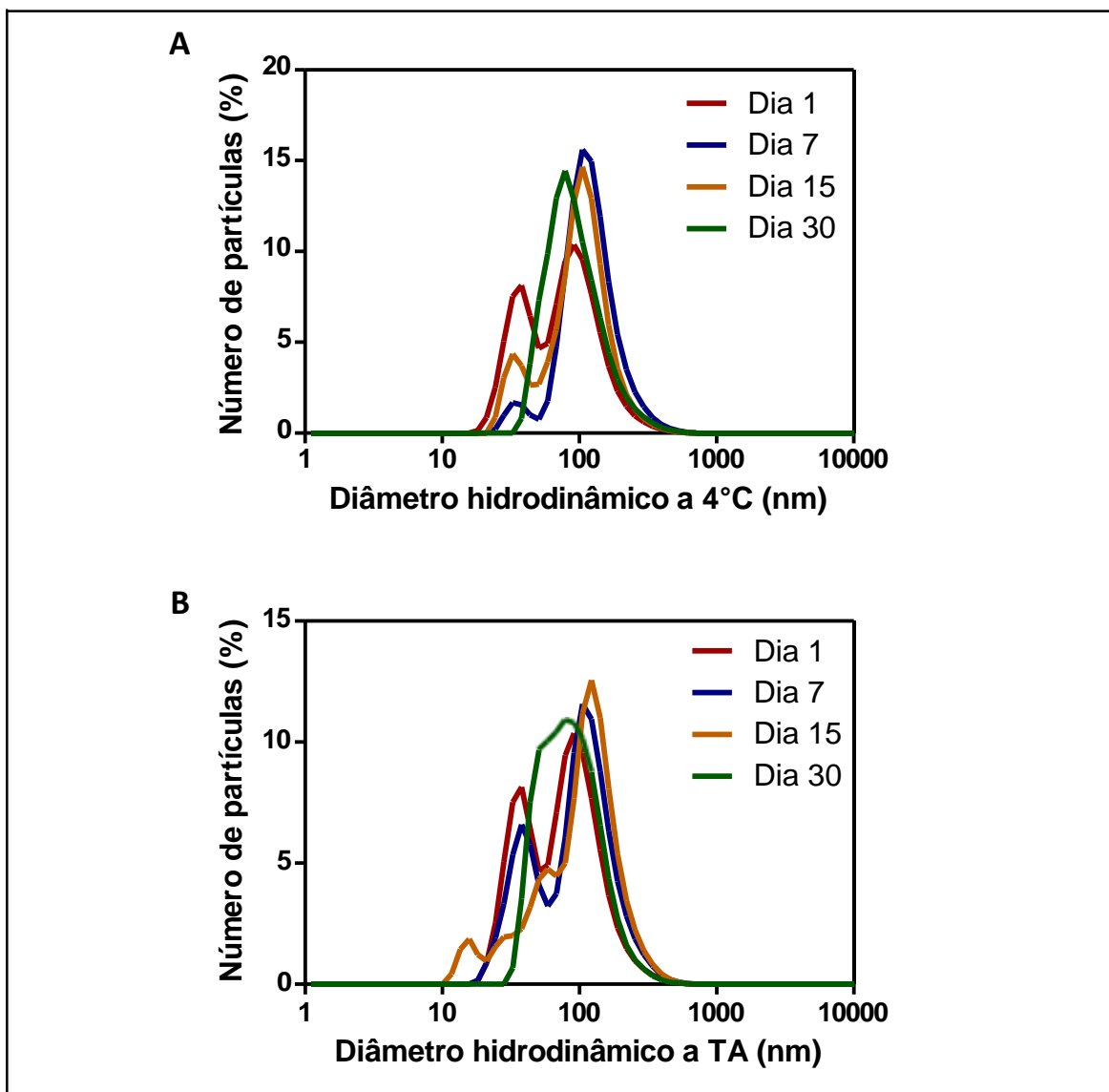


Figura 37: Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número das CH-TPP obtidas a partir da solução de quitosana e de ácido tripolifosfato de sódio (TPP) de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C (A) e T.A. (B).

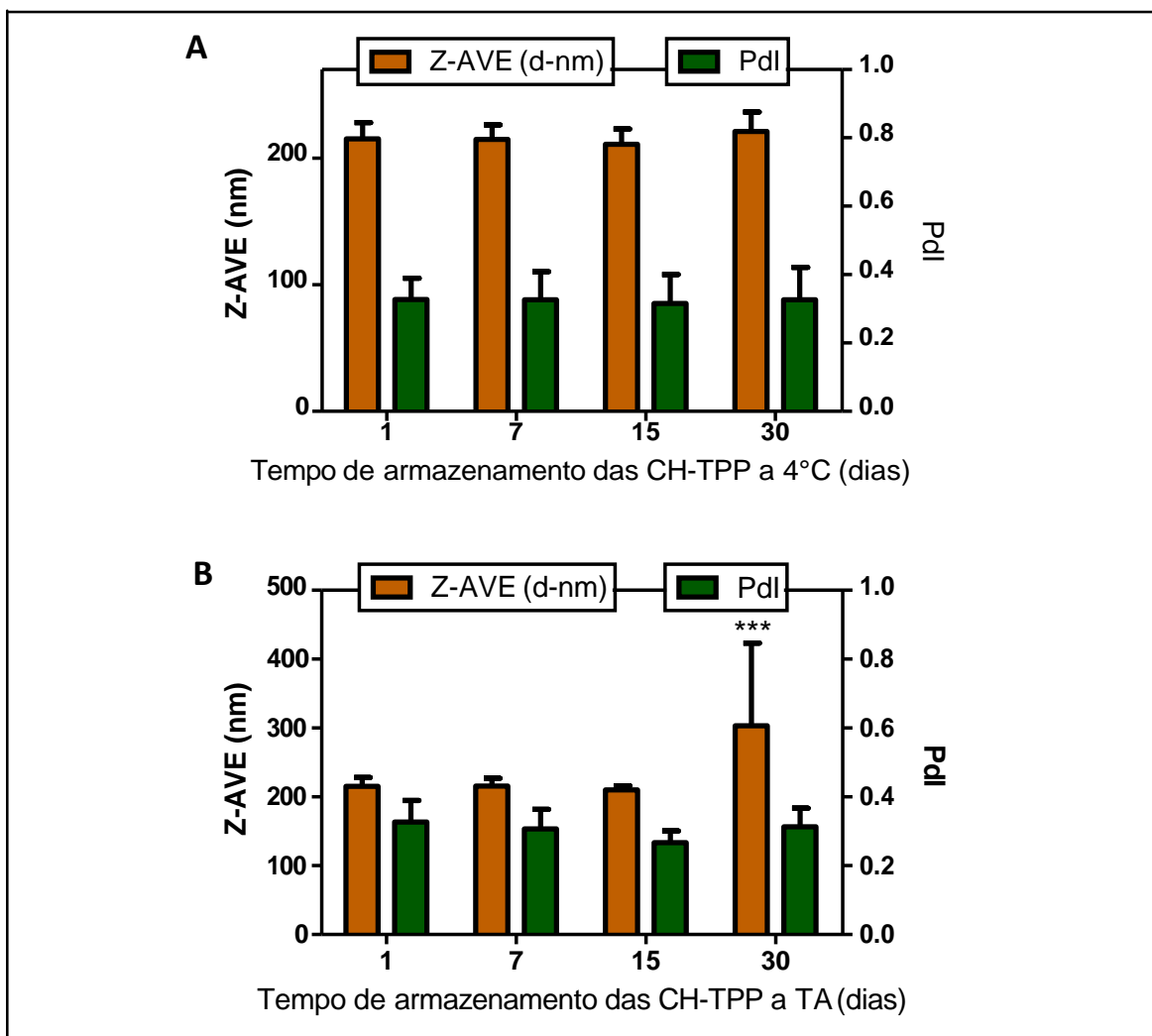


Figura 38: Gráfico representando a distribuição de Z-AVE (nm) e Pdl das CH-TPP de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C (A) e T.A. (B). Teste ANOVA, post teste Bonferroni, *** diferença significativa de Z-average do dia 30 em comparação com o dia 0 (P < 0,0001).

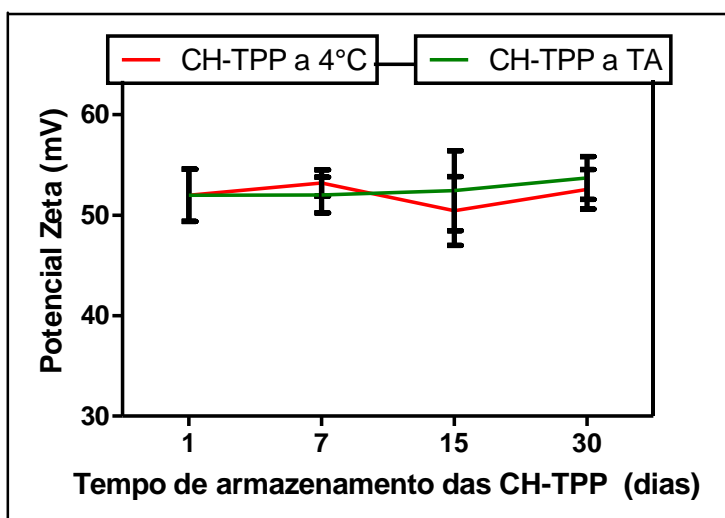


Figura 39: O potencial Zeta (mV) das CH-TPP de acordo com o tempo de armazenamento (1 – 7 – 15 e 30 dias) a 4°C e T.A.

5.2.4 CH-AgNO₃

A estabilidade das AgNO₃ foi monitorada ao longo de 30 dias armazenadas a 4°C. As curvas de distribuição do diâmetro hidrodinâmico apresentam uma única população de 91,2 ± 11,2 nm no dia 1. Essa população se mantém ao longo dos dias, mas a amostra tende a formar uma segunda população de partículas menores após os 7 dias de monitoramento (Figura 40A). Os valores de *Z-average*, Pdl e potencial Zeta não apresentaram diferença significativa entre os dias de análise (Figuras 40B -C).

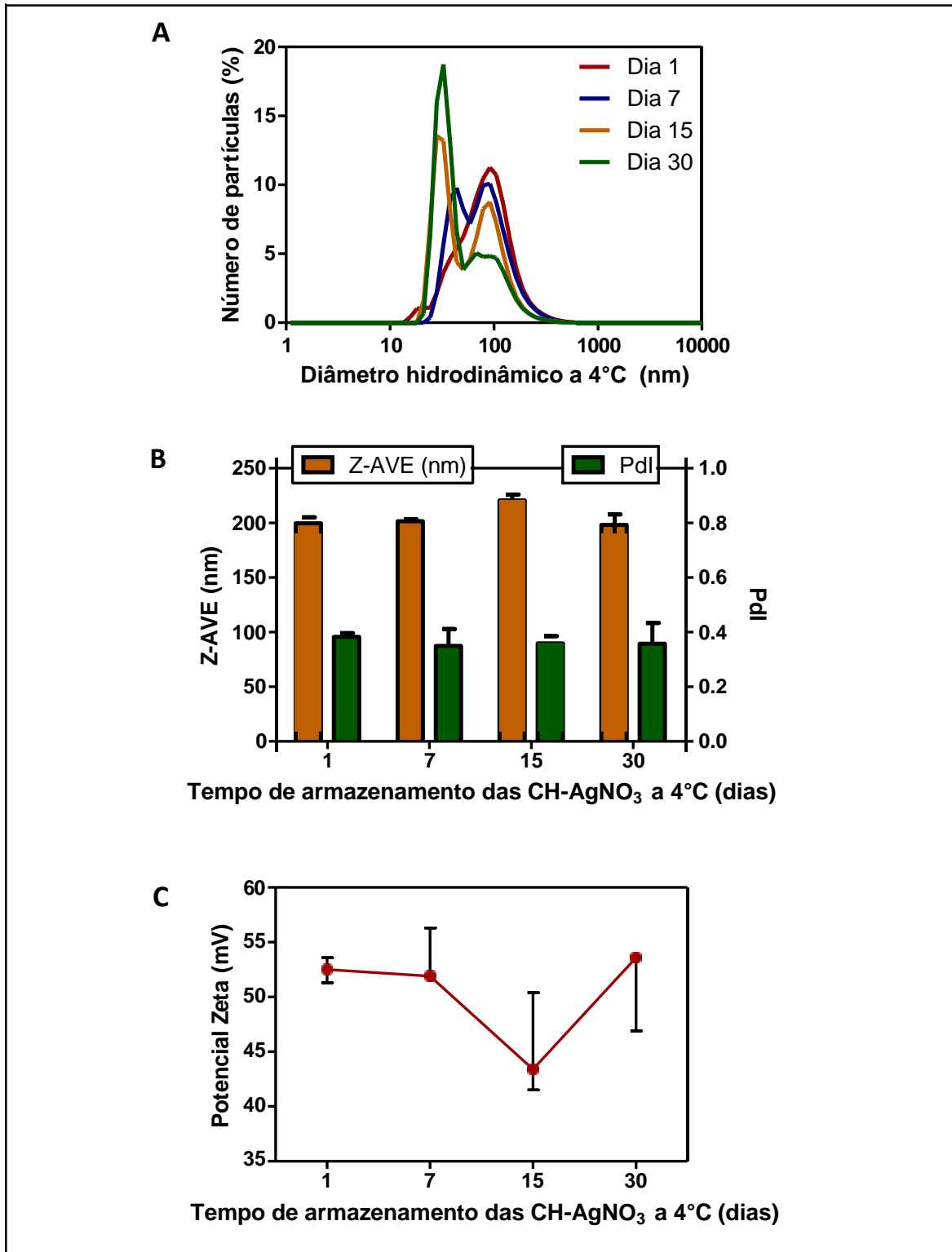


Figura 40: Estabilidade das CH-AgNO₃ ao longo de 30 dias armazenadas a 4°C. Curvas de distribuição de classes de diâmetro hidrodinâmico em número (A), distribuição de Z-Ave (nm) e Pdl (B) e potencial Zeta (mV) (C).

5.3 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADES MOLECULARES DAS ESTRUTURAS

5.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As AgNPs e o EA de *C. longa* foram analisados por FTIR a fim de investigar a presença ou ausência de alguns grupos funcionais possivelmente envolvidos na formação das AgNPs (Figura 41). As amostras contendo quitosana também foram analisadas (Figura 42). Os espectros foram normalizados para facilitar a visualização comparativa de cada um.

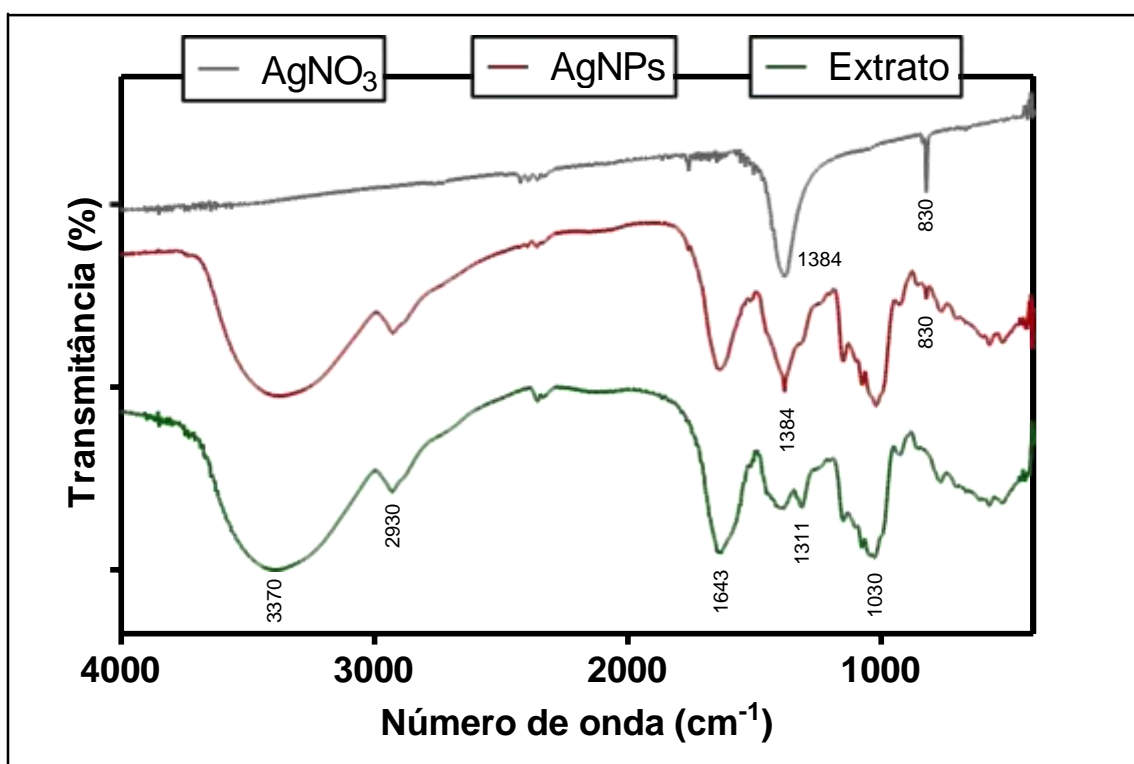


Figura 41: Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das AgNPs sintetizadas com o EA de *C. longa* e dos controles extrato de *C. longa* e AgNO₃.

Os espectros de FTIR das AgNPs e do extrato de *C. longa* estão mostrados na figura 41. Pode-se observar a grande semelhança entre as duas amostras. Ambas apresentaram bandas principais de intensidade similar a 3370, 2930, 1643 e 1030 cm⁻¹.

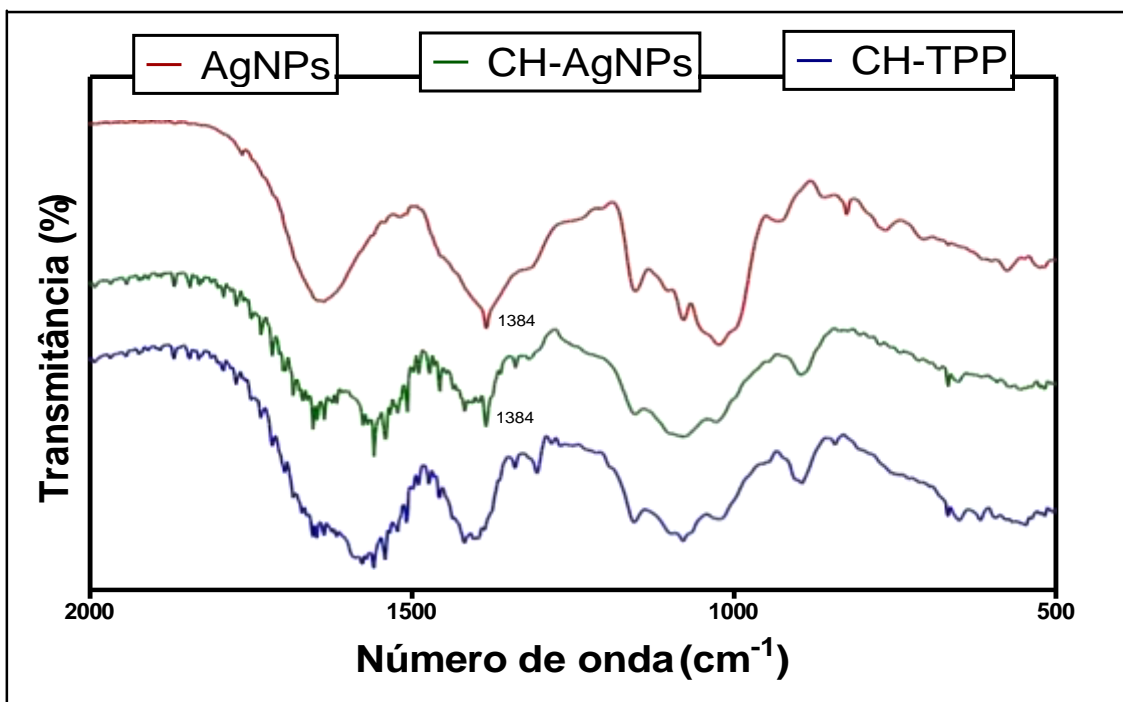


Figura 42: Espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das CH-AgNPs e CH-TPP.

As amostras CH-AgNPs e CH-TPP estão ilustradas na figura 42. Os dois espectros são muito parecidos entre si. Uma única banda apresentou-se consistente para diferenciar os dois espectros. Dessa forma, a região dos espectros de 2000 a 500 cm^{-1} foi destacada (Figura 42). De fato, uma banda foi observada apenas no espectro das CH-AgNPs a 1384 cm^{-1} .

A tabela 10 reagrupa os modos de vibrações dos grupamentos observados nas figuras 41 e 42.

Tabela 10: Modo de vibração das amostras AgNPs e extrato analisadas por FTIR.

MODO DE VIBRAÇÃO	FREQUÊNCIA IR (cm ⁻¹)	REFERÊNCIAS
Estiramento OH	3370	Shameli et al, 2014
Estiramento C-H	2930	Shameli et al, 2014
Estiramento C=O	1643	Li et al, 2011
Estiramento C-O	1311	Shameli et al, 2014
Estiramento C-O-H	1030	Li et al, 2011
Estiramento N-O de NO ₃	1384	Santos et al, 2005
Estiramento N=O de NO ₃	830	Santos et al, 2005

5.3.2 Espectroscopia de massa MALDI/TOF

Os espectros obtidos das AgNPs e dos controles AgNO₃ e extrato estão ilustrados na figura 43. As amostras CH-AgNPs, CH-TPP e CH-AgNO₃ apresentaram apenas picos referentes à matriz e dessa forma, não foram representados. Na figura 43, é possível observar vários picos semelhantes em todas as amostras. Já se sabe que esses picos correspondem à matriz: m/z 172,0; 190,1; 212,1; 234,1; 250,1; 295,2; 335,2; 379,1; 417,1 e 665,8. Entretanto, é possível ressaltar a presença de dois picos a m/z 485,0 e 487,0 na amostra de AgNPs.

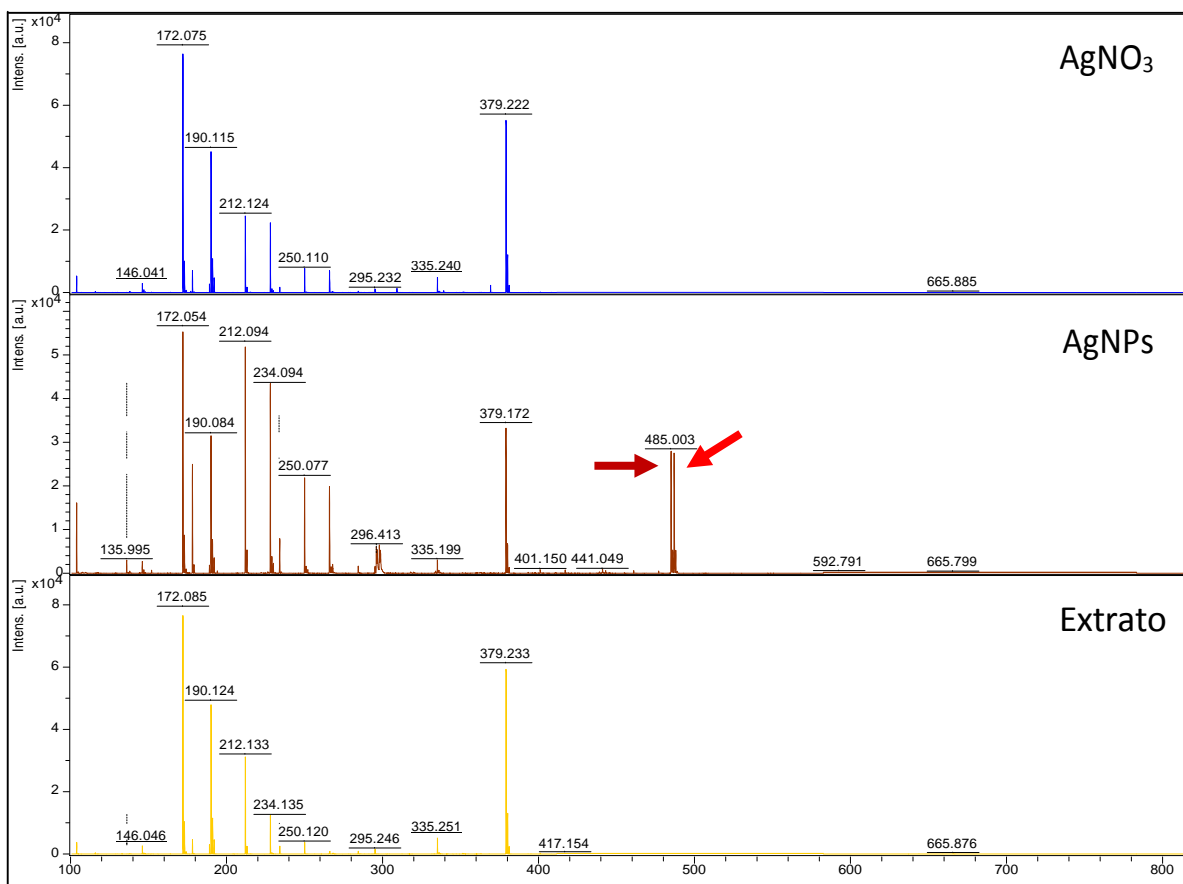


Figura 43: Espectros obtidos por espectroscopia de massa MALDI-TOF das AgNPs à base de *C. longa* e dos controles extrato e AgNO_3 . Picos correspondentes da matriz: m/z 172,0; 190,1; 212,1; 234,1; 250,1; 295,2; 335,2; 379,1; 417,1 e 665,8. A seta vermelha corresponde aos picos de m/z 485,0 e 487,0 observado apenas no espectro de AgNPs.

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

5.4.1 Determinação da Viabilidade Celular – MTT

As células da linhagem A431 foram tratadas com AgNPs, CH-AgNPs e os seus respectivos controles nas concentrações de 20 – 40 – 50 – 60 e 80 μM , considerando a concentração inicial de AgNO_3 (de 1 mM). O controle com água ultrapura representou 100 % de viabilidade celular. Após 24 horas de exposição, foi possível observar a atividade dose-dependente das AgNPs e das CH-AgNPs (Figura 44). A ação citotóxica dessas duas amostras foi muito similar entre si com valor de viabilidade celular de $50,1 \pm 12,8$ e $57,8 \pm 24,3\%$, respectivamente, na concentração intermediária de 50 μM .

Esses valores foram significativamente diferentes em comparação com o controle com água ultrapura. As AgNO_3 e CH-AgNO_3 foram os dois tratamentos mais agressivos, apresentando uma atividade parecida entre si com valores da viabilidade celular inferiores a 10% a partir da concentração de 40 μM . Não houve diferença significativa entre esses valores. As células expostas às CH-TPP apresentaram uma diminuição significativa da viabilidade celular de até 20% a 60 μM . O extrato e o EA fresco representados na figura 44 correspondem ao controle da síntese (extrato que passou 24 horas a 75°C) e ao extrato estoque armazenado a 4°C, respectivamente. Pode-se observar que houve uma diferença significativa da atividade citotóxica entre essas duas amostras. O extrato controle da síntese não apresentou atividade dose-dependente, mantendo a viabilidade celular de 90%. Em paralelo, o EA fresco demonstrou uma atividade dose-dependente.

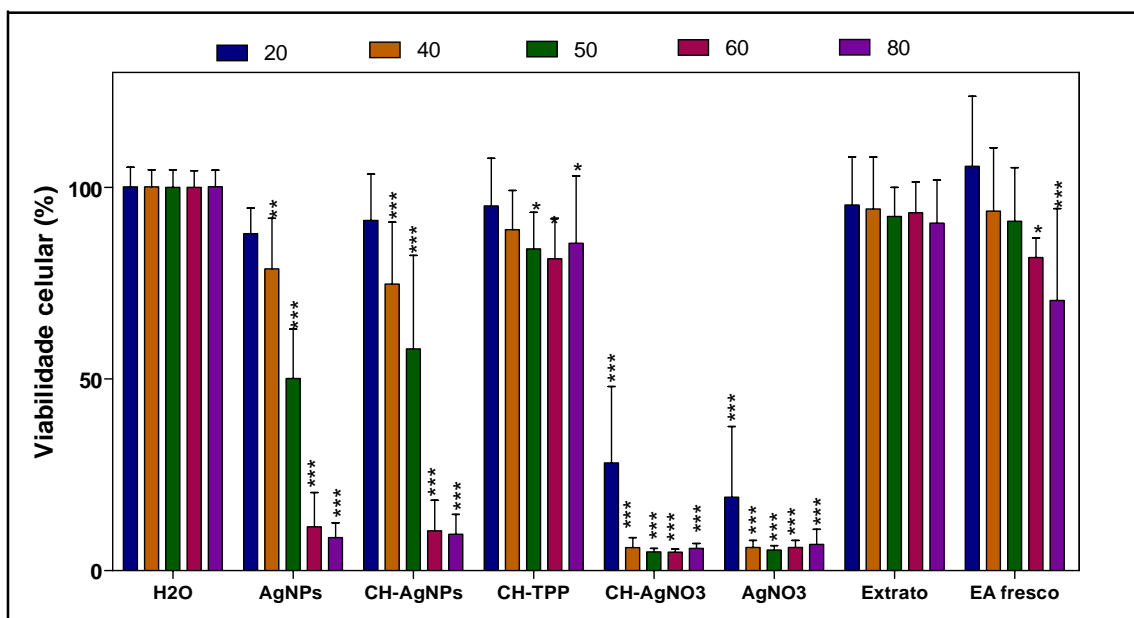


Figura 44: Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermoide (A431) expostas a diferentes concentrações de AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP, CH-AgNO₃, AgNO₃, extrato e EA fresco, equivalentes à concentração de AgNO₃, por 24 horas. O controle com água (H₂O) foi realizado. Representação da média \pm desvio padrão da média de 10 experimentos independentes. Teste ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa em comparação com o controle H₂O: * P < 0,05; ** P < 0,001 e *** P < 0,0001.

Os diferentes tratamentos foram avaliados também em linhagem de queratinócitos normais (HaCAT) para determinar a especificidade da atividade em células tumorais. Entretanto, de acordo com a figura 45, pode-se observar que as AgNPs e as CH-AgNPs foram mais citotóxicas em células saudáveis. Essa diferença é principalmente visível na concentração de 50 μM que reduziu em torno de 50% da viabilidade celular das células cancerígenas contra quase 90% em células saudáveis. As amostras AgNO_3 e CH-AgNO_3 apresentam uma expressiva citotoxicidade comparável com a atividade observada em células de CE (A431). As CH-TPP não demonstraram atividade significativa contra as células HaCAT e o extrato e EA fresco apresentaram atividade similar entre si (Figura 45).

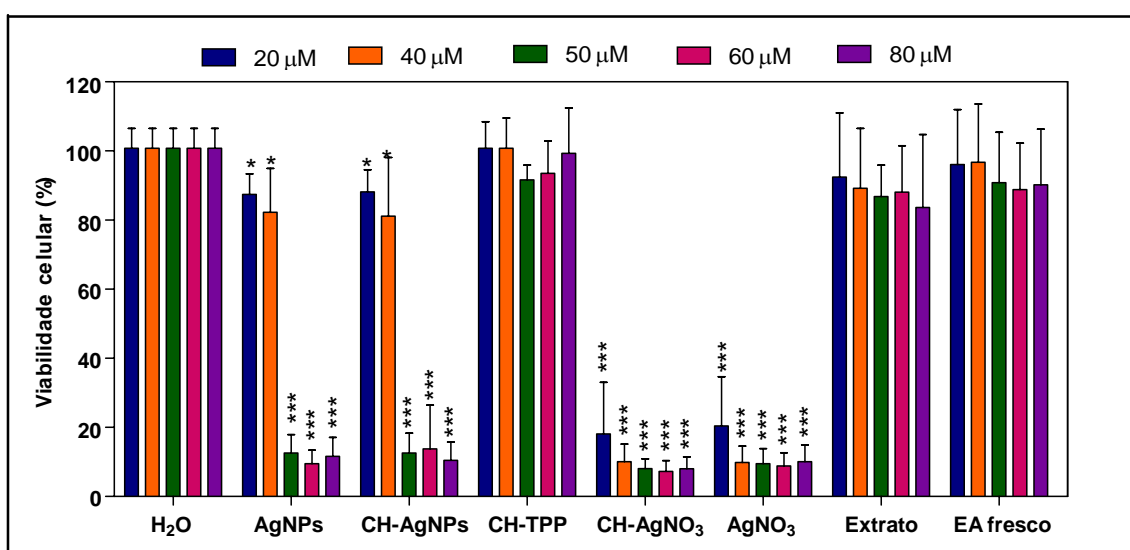


Figura 45: Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos (HaCAT) expostas a diferentes concentrações de AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP, CH-AgNO₃, AgNO₃, extrato e EA fresco, equivalentes à concentração de AgNO₃, por 24 horas. O controle com água (H₂O) foi realizado. Representação da média \pm desvio padrão da média de 10 experimentos independentes. Teste ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa em comparação com o controle H₂O: * P < 0,5 e *** P < 0,0001.

Não foi observada diferença significativa da atividade citotóxica em células de CE (A431) e queratinócitos (HaCAT) após 72 horas de exposição aos diferentes tratamentos (dado não mostrado).

5.4.2 Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular

O ensaio de azul de tripan foi utilizado para investigar os efeitos das AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e AgNO₃, na concentração de 50 µM, na integridade de membrana plasmática e na proliferação celular das células de CE (A431) após 24 horas de exposição. A água ultrapura (H₂O), o paclitaxel (PTX) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram empregados como controles.

O grupo controle H₂O apresentou 96,9 ± 14,0% de células com membrana plasmática íntegra e 3,0 ± 1,7% de células com membrana lesionada. O grupo paclitaxel (PTX) apresentou 21,3 ± 1,0% de células com membrana lesionada, mas a diferença com o controle não foi significativa. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o AgNO₃ apresentaram 100% de lesão de membrana. Após a exposição às AgNPs e CH-AgNPs pode-se observar que 53,4 ± 11,7% e 43,4 ± 2,7% das células sofreram lesão de membrana, respectivamente. As CH-TPP não induziram alterações na integridade da membrana plasmática das células A431 (Figura 46), embora, foi possível observar atividade citotóxica por meio do ensaio de viabilidade celular nesta concentração (Figura 44).

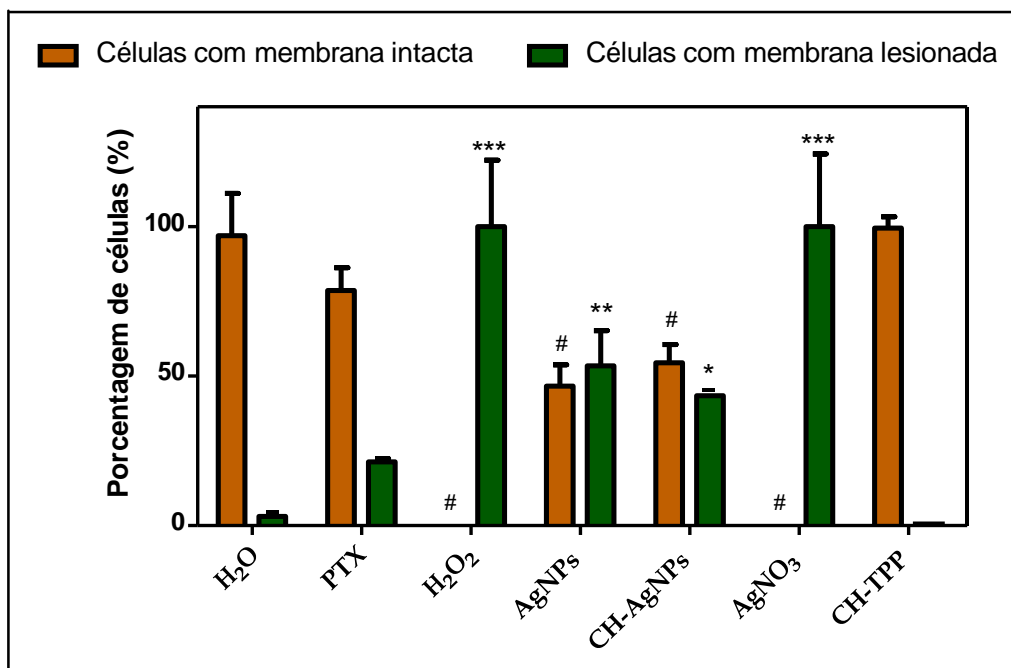


Figura 46: Porcentagem de células de Carcinoma epidermoide com e sem lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs a 50 μ M e aos controles Paclitaxel (PTX) a 50 nM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 29,4 μ M e água ultra pura (H₂O). Teste ANOVA, post-teste Bonferroni: membrana intacta (#: P < 0,0001) e membrana lesionada (*: P < 0,5; **: P < 0,001 e ***: P < 0,0001)

O ensaio de azul de tripan permitiu também determinar se os diferentes tratamentos possuíam um efeito na proliferação celular após 24 horas de exposição. De acordo com a figura 47, todos os tratamentos, na exceção da CH-TTP, induziram uma redução significativa dos números totais de células em comparação com o controle H₂O. As AgNPs e CH-AgNPs não apresentaram efeito significativamente diferente entre si.

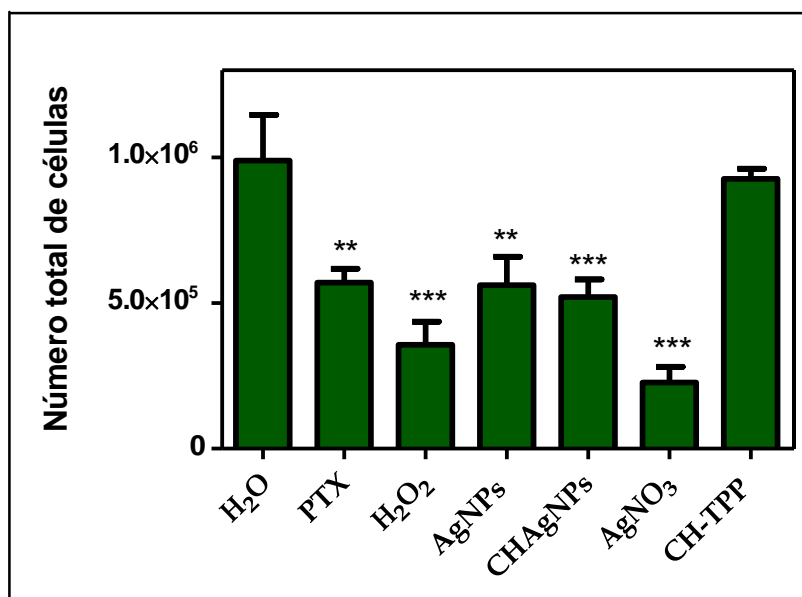


Figura 47: Avaliação por Azul de tripan do número total de células de carcinoma epidermoide após exposição por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e AgNO₃ a 50 μM e os controles Paclitaxel (PTX) a 50 nM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 29,4 μM e água ultra pura (H₂O). Contagem das células em câmara de Neubauer. Diferença significativa quando comparado com o H₂O (**: P< 0,001 e ***: P<0,0001).

5.4.3 Avaliação da morfologia das células por microscopia com contraste de fase

A morfologia das células foi avaliada logo após o tratamento e depois das 24 horas de exposição em microscópio invertido com contraste de fase. A água ultrapura foi utilizada como controle. A figura 48 ilustra as imagens obtidas por microscopia no aumento de 200 x. Não foi possível observar modificação nítida na morfologia das células após exposição às AgNPs e CH-AgNPs em comparação com o controle com H₂O. Entretanto, foi observado um aumento do número de células isoladas após 24 horas de exposição às estas amostras. Além disso, as imagens das células tratadas com CH-AgNPs apresentam um precipitado (seta vermelha) correspondente à própria quitosana em excesso (Figura 48). As células tratadas com AgNO₃ apresentaram uma mudança drástica de morfologia logo após a exposição (seta azul - Figura48).

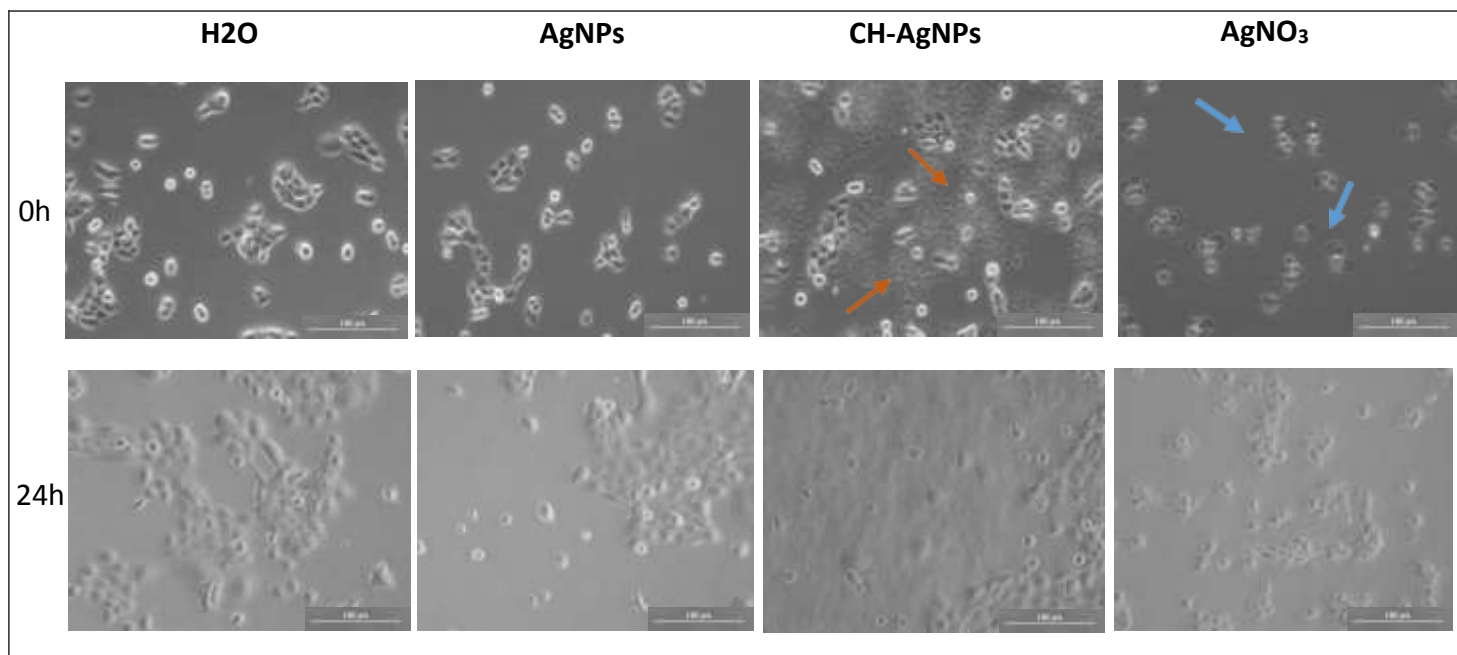


Figura 48: Imagens de microscopia com contraste de fase das células de Carcinoma epidermoide (A431) logo após o tratamento (0h) e depois 24 horas de exposição ao controle H₂O, às AgNPs, CH-AgNPs e ao AgNO₃ na concentração de 50 µM. Setas vermelhas: quitosana precipitada; setas azuis: células lesionadas após exposição ao AgNO₃. Barra de escala = 100 µm.

5.4.4 Citometria de fluxo (FACS)

A técnica de Citometria de fluxo foi empregada para determinar os mecanismos de ação das amostras testadas em linhagem de CE– A431. Além desses dados, o método permite determinar a morfologia das células de acordo com o tamanho (FSC-H) e a granulosidade (SSC-H) (Figura 49). Os *Dot plot* ilustrados na figura 48 representam a morfologia das células após tratamento por AgNPs (Figura 49B), CH-AgNPs (Figura 49C), AgNO₃ (Figura 49D) e CH-TPP (Figura 49E). As células do grupo controle foram utilizadas como referência para dividir os *Dot plot* em quatro quadrantes.

As fotomicrografias representadas na figura 48 não mostraram uma nítida mudança da morfologia celular após 24 horas de exposição às AgNPs e CH-AgNPs em

relação ao controle. Entretanto, por análise no FACS pode-se observar que as células expostas às AgNPs e CH-AgNPs tenderam a diminuir de tamanho (FSC) e reduzir sua granulosidade (SSC), em comparação com o controle (Figura 49). A exposição à solução de AgNO₃ diminuiu drasticamente o tamanho das células, confirmando os resultados de avaliação da morfologia por microscopia invertida (Figura 48D).

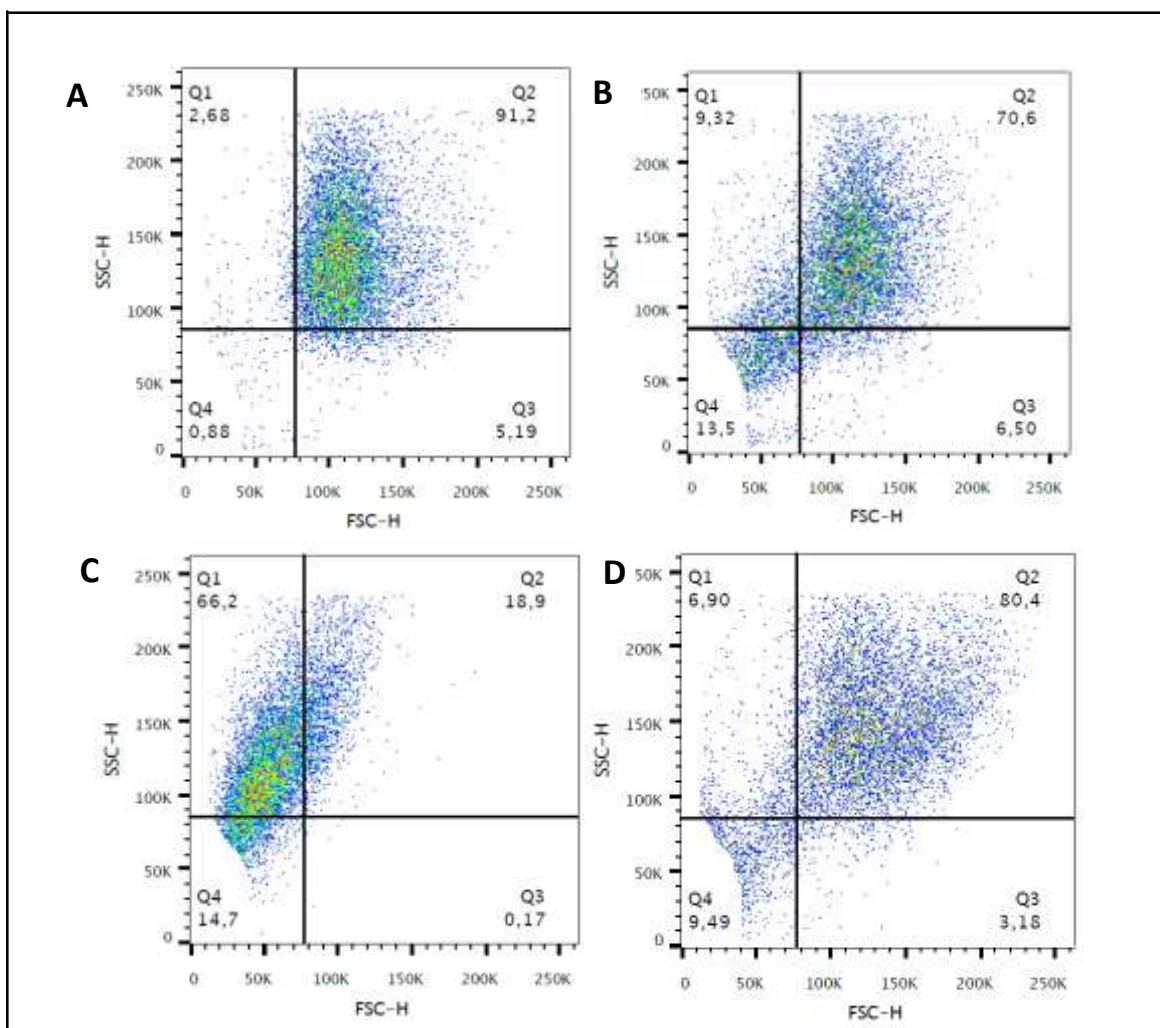


Figura 49: Avaliação de parâmetros morfológicos da suspensão de células da linhagem de Carcinoma epidermoide (A431) por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com AgNPs (B), AgNO₃ (C) e CH-AgNPs (D) na concentração de 50 µM. Grupo controle (A). Legenda: FSC – tamanho; SSC- granulidade.

5.4.4.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular

As células de CE (A431) foram expostas às AgNPs, CH-AgNPs e AgNO₃ na concentração de 50 µM. Após 24 horas, foi possível observar um aumento significativo de proporção de DNA fragmentado em comparação com o grupo controle em torno de 30 para as células expostas às AgNPs e CH-AgNPs, e 90% para o AgNO₃. A exposição às CH-TPP na concentração de 50 µM apresentou o mesmo perfil que o controle (Figura 50).

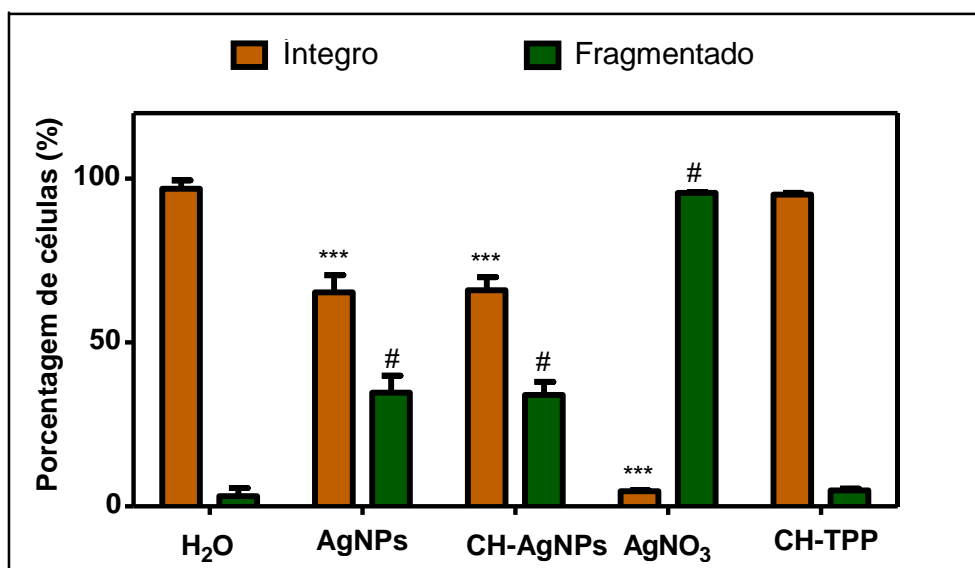


Figura 50: Avaliação da fragmentação de DNA por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO₃ e CH-TPP a 50 µM em linhagem de Carcinoma epidermoide (A431). Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: DNA íntegro e #: DNA fragmentado (P<0,0001)).

De acordo com a figura 51, é possível observar que as AgNPs e CH-TPP não modificaram de forma significativa o perfil do ciclo celular. Entretanto, o número de células expostas às CH-AgNPs diminuiu na fase G2 (10%) para aumentar na fase G1 (15%) de forma significativa em comparação com o grupo controle. O aumento de 15% das células na fase G1 também foi observado após a exposição ao AgNO₃, contudo, houve diminuição do número de células na fase S também de 15%. (Figura 51).

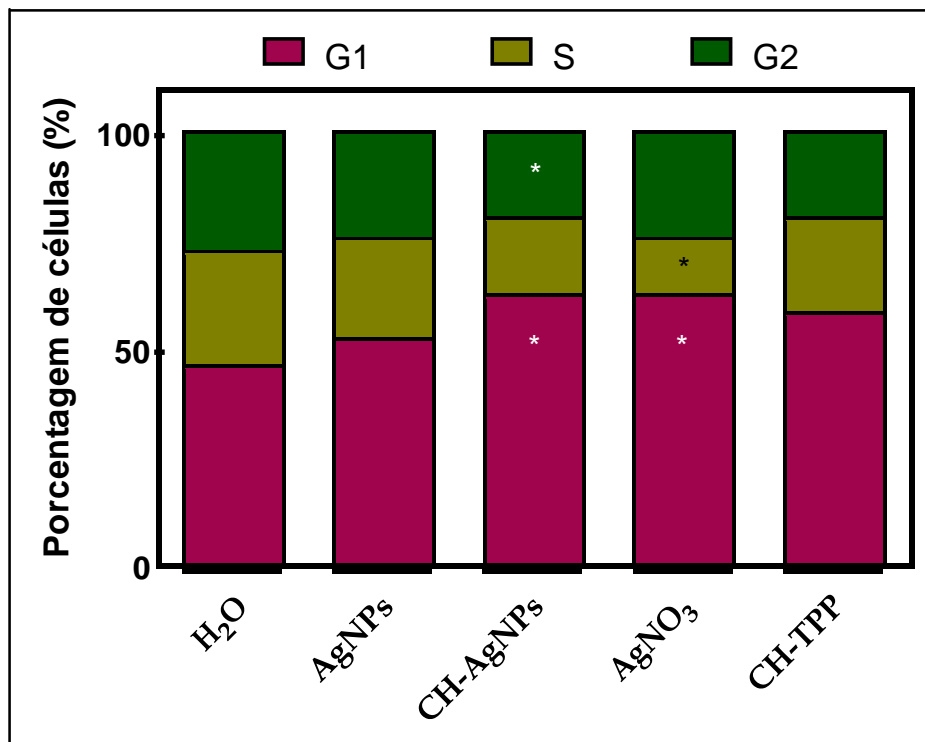


Figura 51: Avaliação do ciclo celular por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO₃ e CH-TPP na concentração de 50 μ M em linhagem de carcinoma epidermoide (A431). Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (*: P < 0,05).

5.4.4.2 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

As células de CE (A431) foram expostas por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO₃ e CH-TPP na concentração de 50 μ M. A partir da figura 52, é possível determinar se houve modificação do $\Delta\psi_m$ observando o deslocamento das curvas referentes aos diferentes tratamentos AgNPs, AgNO₃, CH-AgNPs e CH-TPP em comparação com a curva controle representada pela cor preta (Figuras 52 A-B-C-D). A maioria das células expostas às AgNPs não apresentaram mudança de $\Delta\psi_m$. Entretanto, é possível notar que uma pequena proporção das células foi representada pelo deslocamento da curva vermelha em comparação com a curva preta, referente ao controle (Figura 52A). Esse deslocamento para direita da curva corresponde ao aumento do $\Delta\psi_m$. A exposição das células ao AgNO₃ e às CH-AgNPs resultou em um

aumento significativo do $\Delta\psi_m$ (Figura 52B-C). As CH-TPP não apresentaram atividade significativa no $\Delta\psi_m$ após 24 horas de exposição (Figura 52D).

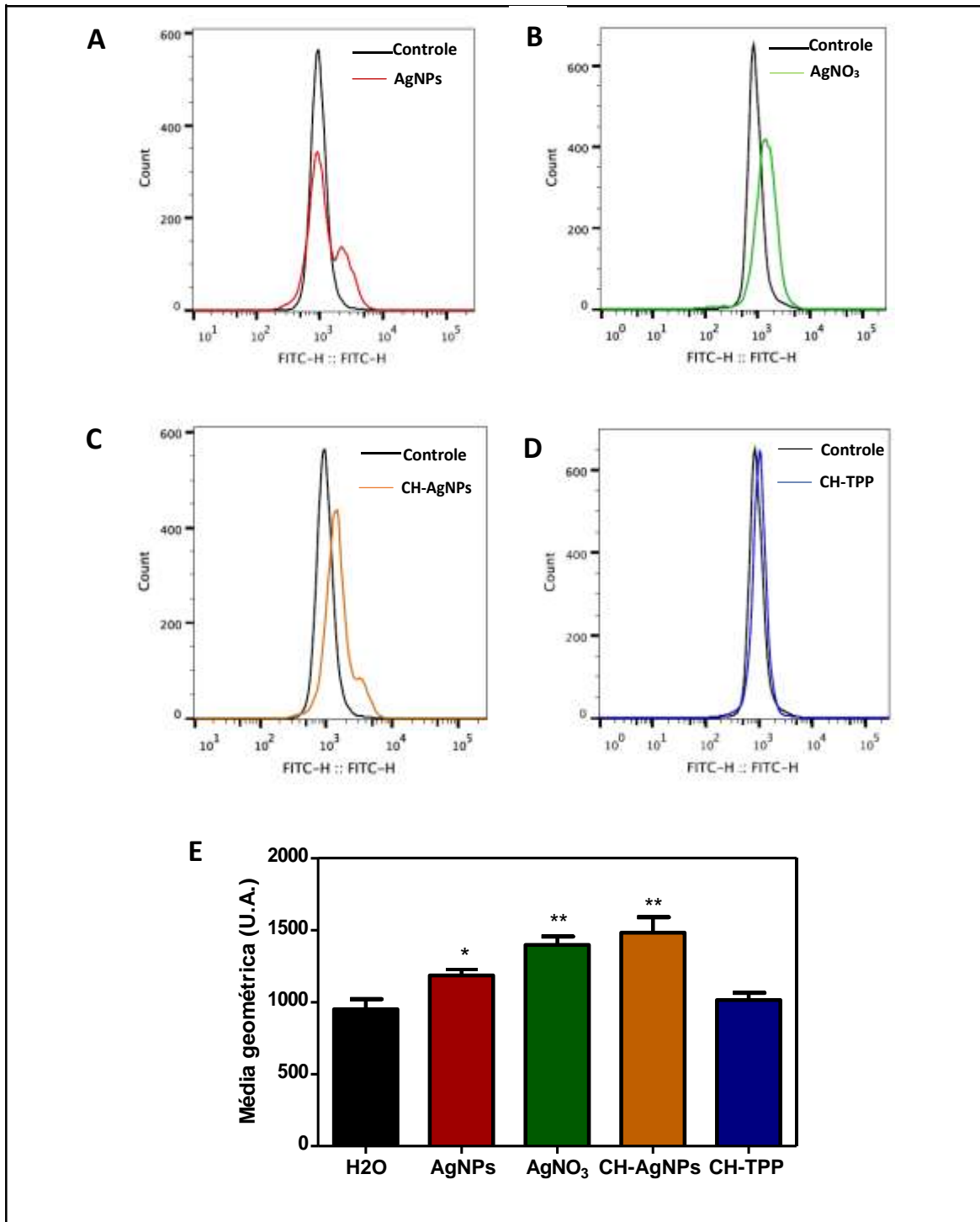


Figura 52: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) avaliado por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição das células de Carcinoma epidermoide (A431) às AgNPs (A), AgNO₃ (B), CH-AgNPs (C) e CH-TPP (D) na concentração de 50 μ M. Representação do $\Delta\psi_m$ a partir da média geométrica após os diferentes tratamentos (E). Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa em comparação com o grupo controle (*: $P < 0,001$ e **: $P < 0,0001$).

A figura 52E corresponde a outra representação da influência dos tratamentos no $\Delta\psi_m$ utilizando-se a média geométrica. Pode-se observar que a exposição ao AgNO_3 e às CH-AgNPs aumentou de forma significativa o valor da média geométrica em aproximadamente 47%, correspondendo ao aumento do $\Delta\psi_m$. As AgNPs apresentaram também um aumento do valor da média geométrica de forma significativa em torno de 24%, entretanto, não tanto quanto às CH-AgNPs e AgNO_3 . As CH-TPP não apresentaram atividade significativa no $\Delta\psi_m$. Esses dados confirmam os resultados observados na figura 52A – B – C e D.

5.4.4.3 Exposição de fosfatidilserina

Após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e AgNO_3 , as células foram marcadas por Anexina-V e PI e analisadas por citometria de fluxo. O ajuste dos parâmetros do equipamento para a detecção adequada dos dois marcadores foi realizado utilizando células marcadas apenas com Anexina-V (Figura 53A) e células marcadas apenas com PI (Figura 53B) após o tratamento com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 24 horas. A detecção da marcação por Anexina-V é representada pelo eixo X (FTIC-A) e a detecção do PI corresponde ao eixo Y (Propidium Iodide-A). Cada *Dot plot* está dividido em quatro quadrantes. O quadrante 1 (Q1) representa as células marcadas apenas com o PI; o Q2 representa as células marcadas com o PI e com a Anexina-V; o Q3 representa as células marcadas apenas com a Anexina-V e o Q4 representa as células não marcadas (Figura 53). Essa divisão foi utilizada como padrão para determinar a marcação das células após os diferentes tratamentos (Figura 54).

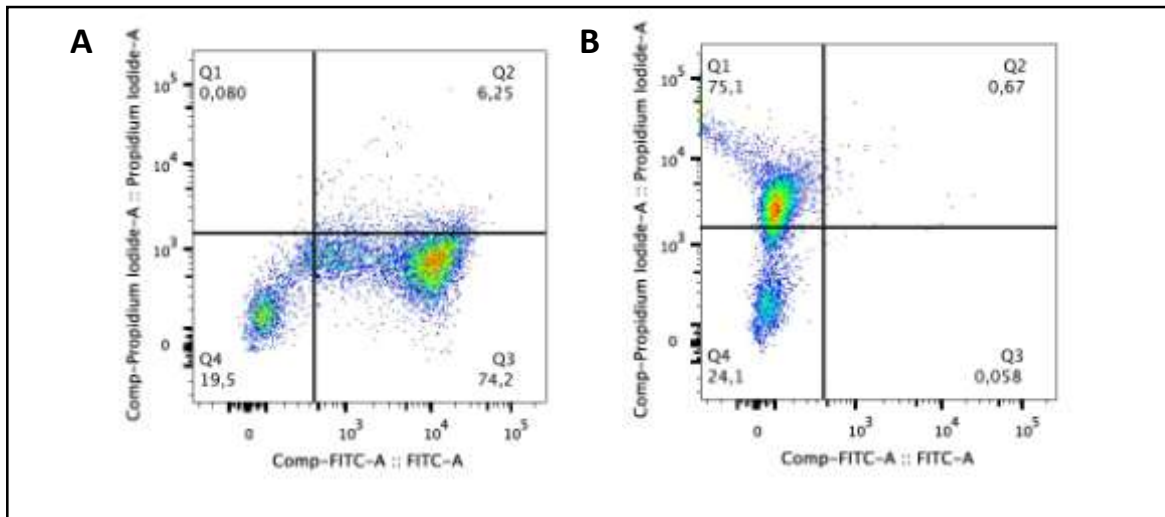


Figura 53: *Dot plot* dos ajustes dos parâmetros para a detecção dos marcadores após o tratamento das células de Carcinoma epidermoide (A431) com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a marcação apenas com Anexina-V (A) e apenas com Iodeto de propídeo (PI) (B).

O Paclitaxel (PTX), um antimicrotúbulo associado à morte celular por apoptose, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um agente oxidante ligado à morte celular por necrose, foram utilizados como tratamentos controles positivos do ensaio. A maioria das células expostas ao PTX não apresentaram marcação (1) e é possível observar uma população de células marcadas principalmente por Anexina-V (2). Em paralelo, a maioria das células expostas ao H_2O_2 apresentaram uma dupla marcação Anexina-V e PI (Figura 54A e B).

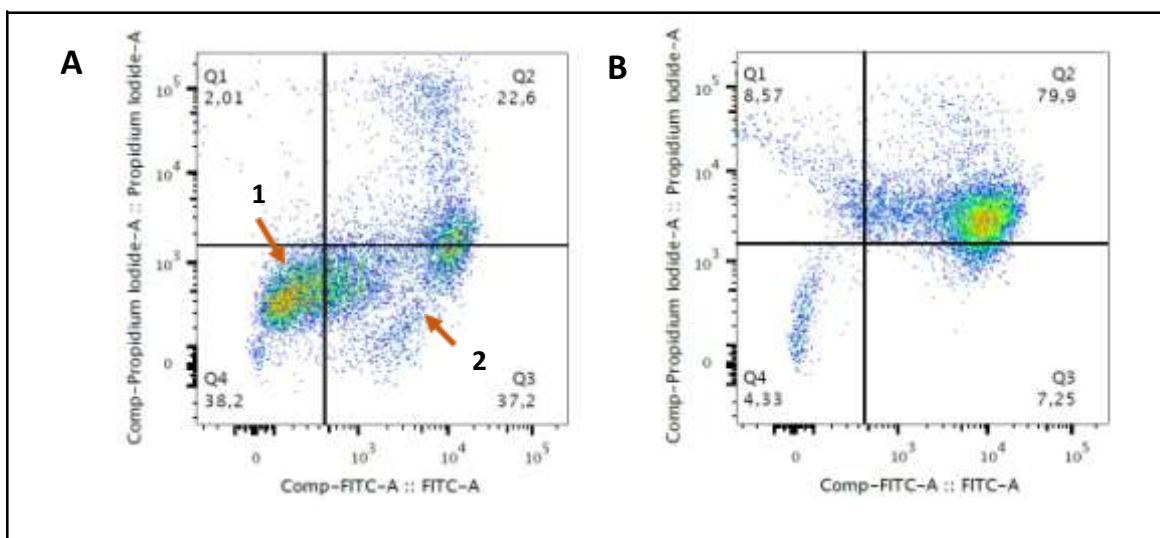


Figura 54: *Dot plot* da avaliação de morte celular das células de Carcinoma epidermoide-A431 marcadas com Anexina-V e Iodeto de propídeo (PI) após tratamento com Paclitaxel (PTX) (A) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B).

O grupo controle com água ultrapura, como esperado, não apresentou marcação e serviu como referência para analisar os demais tratamentos (Figura 55A). As células expostas às AgNPs foram marcadas tanto por Anexina-V quanto por PI. É possível notar a presença de três populações de células. A (1) permaneceu não marcada representando as células viáveis, a (2) apresentou marcação por Anexina-V e PI, referentes às células em fase inicial de apoptose, e a (3) foi marcada por Anexina-V e PI. Entretanto, é possível observar que a marcação por PI foi maior em comparação com a população (2), o que pode sugerir que as células se encontram em fase de apoptose tardia ou em necrose (Figura 55B – setas vermelhas). As células tratadas por CH-AgNPs apresentaram duas populações; a (1) foi marcada apenas por Anexina-V e a (2) marcada por ambos marcadores. A presença de células viáveis não marcadas é muito menor em comparação com o tratamento com AgNPs (Figura 55C – setas vermelhas). A maioria das células expostas ao AgNO₃ foram marcadas principalmente por ambos marcadores (Figura 55D – seta vermelha).

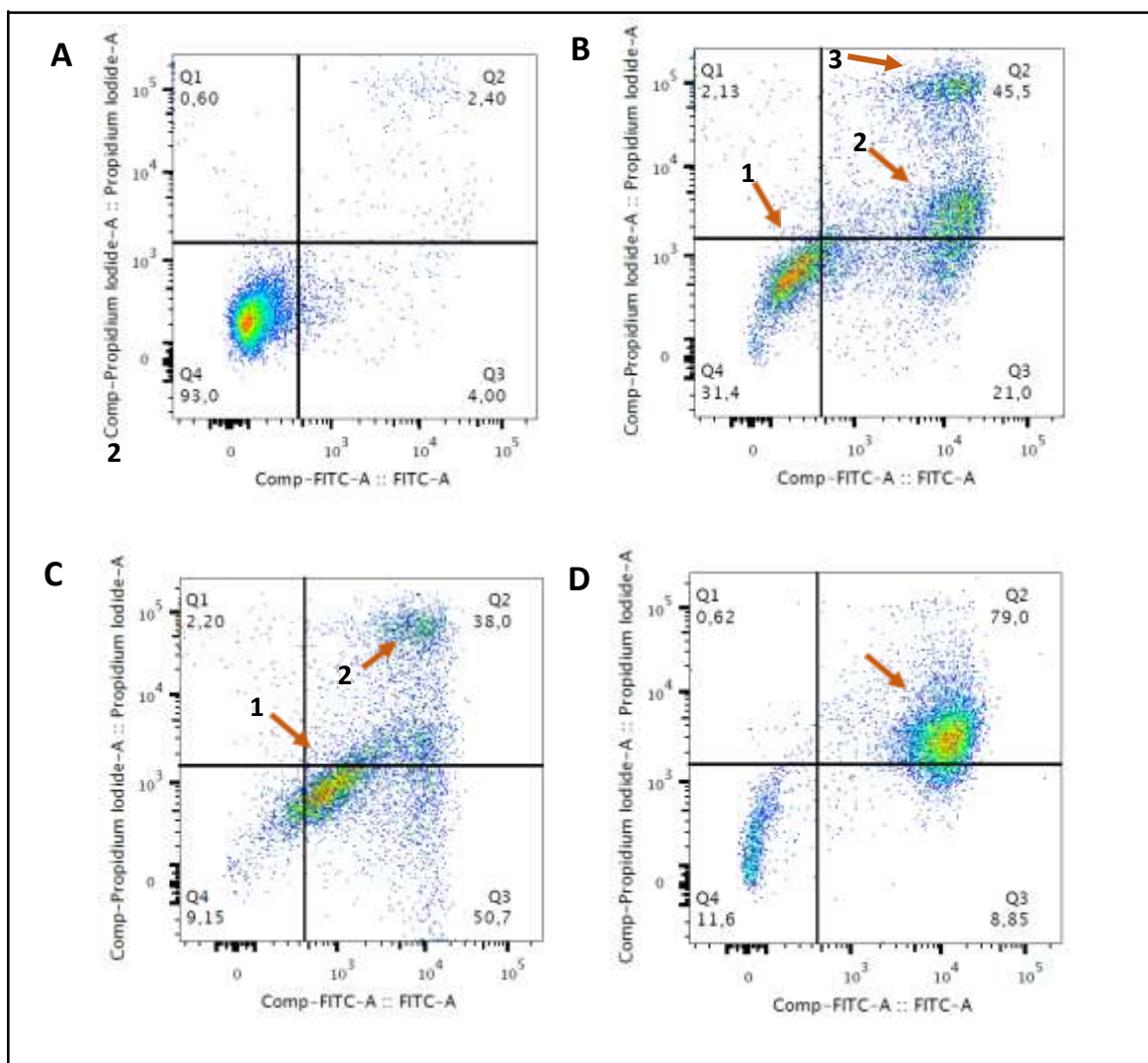


Figura 55 *Dot plot* da avaliação de morte celular de células Carcinoma epidermoide-A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição ao controle com H₂O (A), AgNPs (B), CH-AgNPs (C) e AgNO₃ (D) na concentração de 50 µM.

A influência das CH-TPP no processo de morte celular foi avaliada em um experimento independente com o próprio controle com água ultrapura e os próprios ajustes dos parâmetros de marcação por Anexina-V e PI. Dessa forma, o resultado foi apresentado separadamente na figura 56. É possível notar que a exposição às CH-TPP não levou à detecção de nenhum dos dois marcadores, sugerindo que o tratamento não levou à morte celular após 24 horas.

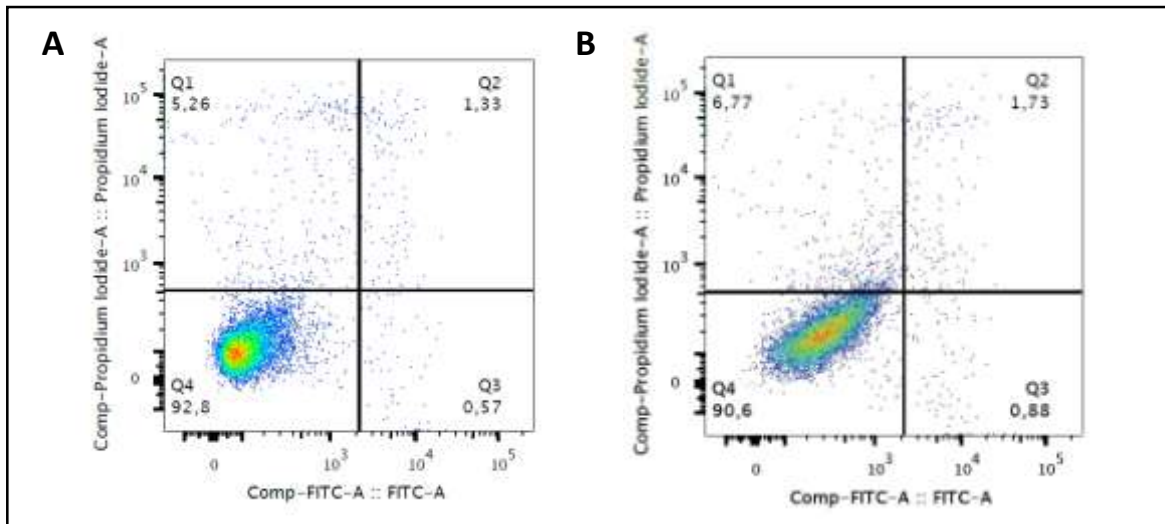


Figura 56: *Dot plot* da avaliação de morte celular de células Carcinoma epidermoide-A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição ao controle com H₂O (A) e CH-TPP (B) na concentração de 50 μM.

Cada um dos gráficos ilustrados na figura 57 representa um dos quadrantes dos *Dot plot* expostos nas figuras 55 e 56. É possível notar que houve um aumento significativo de mais de 100% da marcação de PI para as células tratadas com AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e os controles positivos PTX e H₂O₂ (Figuras 57A). A detecção de células duplamente marcadas aumentou de forma significativa de 44% após exposição às AgNPs, CH-AgNPs, de 87% após exposição ao AgNO₃ e de 22 e 80 % após tratamento com os controles positivos PTX e H₂O₂, respectivamente (Figuras 57B). A marcação por Anexina-V aumentou com o tratamento por AgNPs (20%), CH-AgNPs (51%) e PTX (37%) (Figuras 57C). Apenas o tratamento por CH-TPP não reduziu de forma significativa a quantidade de células viáveis não marcadas (Figuras 57D).

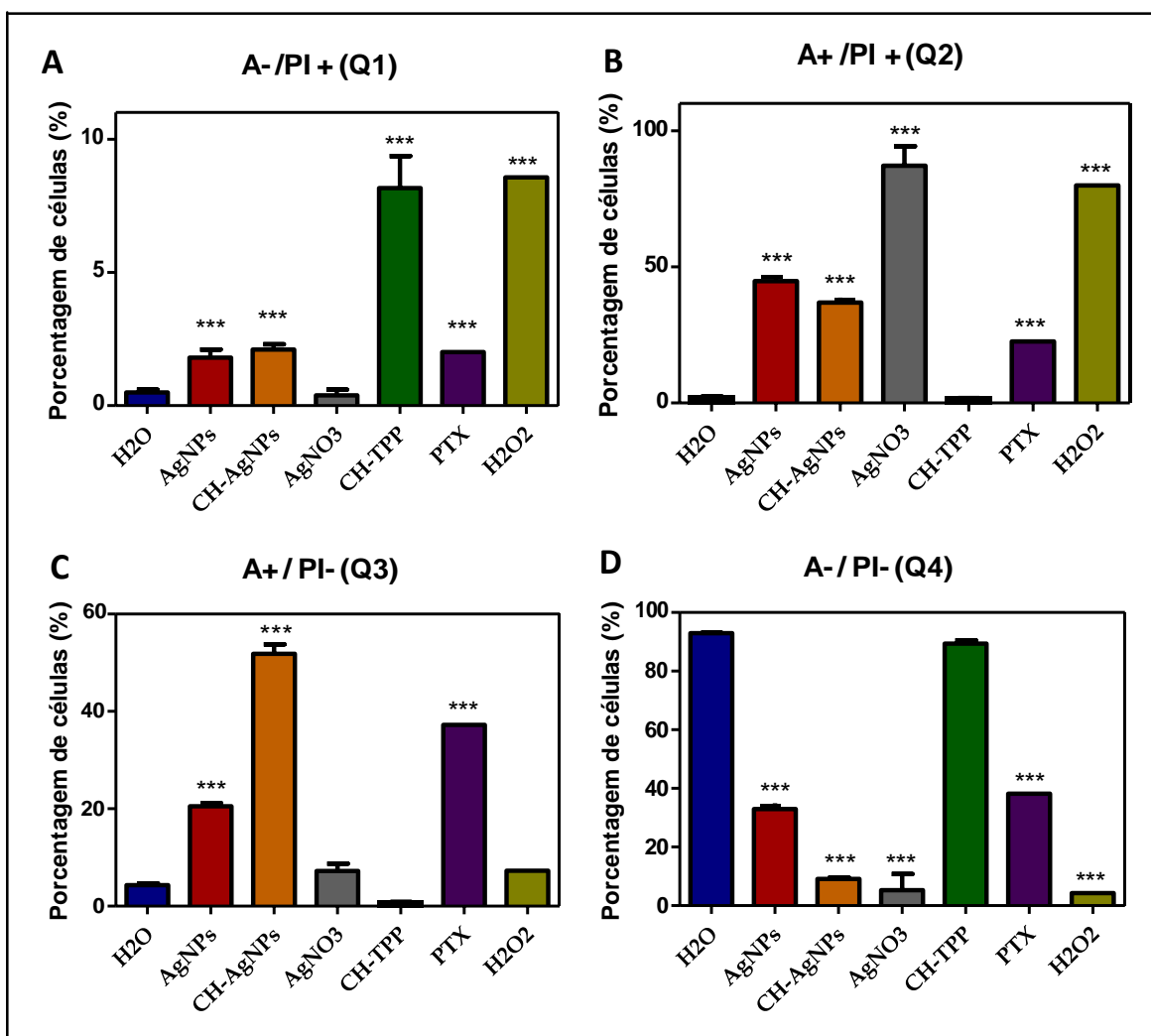


Figura 57: Avaliação da morte celular em linhagem de Carcinoma epidermoide-A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição às AgNPs, CH-AgNPs, AgNO₃ e CH-TPP na concentração de 50 µM. Marcação positiva por Anexina-V: A+; marcação negativa por Anexina-V: A-; marcação positivo por Iodeto de propídeo: PI+ e marcação negativo por PI: PI-. Os gráficos representam cada quadrante: Q1-células mortas (A-, PI+) (A); Q2-células em estágio de apoptose tardia (A+, PI+) (B); Q3-células em estágios iniciais de apoptose (A+, PI-) (C) e Q4-células não apoptóticas ou viáveis (A-, PI-) (D). A água ultrapura (H₂O), o Paclitaxel (PTX) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram utilizados como controles. Diferença significativa quando comparado com controle (***: P<0,0001).

Os resultados dos ensaios biológicos em células de CE (A431) após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e AgNO₃ foram compilados na tabela 11.

Tabela 11: Compilação dos resultados dos ensaios biológicos em células de Carcinoma epidermoide (A431) após 24 horas de exposição às AgNPs, CH-AgNPs, CH-TPP e AgNO₃ a 50 µM. NA: não alterado (em comparação com controle).

	H ₂ O	AgNPs	CH-AgNPs	CH-TPP	AgNO ₃
Viabilidade celular - MTT	100%	Dose dependente	Dose dependente	>80%	< 19,1%
Lesão de membrana	3,0%	53,4%	43,4%	0,5%	100%
Proliferação celular	Considerado como 100%	Diminuição de 57,5%	Diminuição de 36%	NA	Diminuição de 56,7%
Fragmentação de DNA	3,0%	34,6%	34,0%	NA	95,6%
Ciclo celular	G1: 46% S: 26% G2: 28%	G1: 52% S: 22% G2: 25%	G1: 61,3% S: 19% G2: 20,7%	G1: 58% S: 21% G2: 20%	G1: 63% S: 13% G2: 23%
Potencial de membrana mitocondrial	Normal	Aumentado	Aumentado	NA	Aumentado
Marcação por PI	0,5%	1,8%	2,1%	NA	8,1%
Marcação por Anexina-V	4,3%	20,5%	51,8%	NA	NA
Marcação por PI/Anexina-V	2,1%	44,7%	36,9%	NA	87,1%

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado tendo como principal objetivo sintetizar AgNPs a partir de extrato aquoso de *C. longa*, recobri-las com o biopolímero quitosana e avaliar as suas características e mecanismos de ação em linhagem de CE (A431). A primeira fase do trabalho consistiu na investigação dos fatores que influenciam o processo de síntese para a produção de AgNPs à base de *C. longa*. Em seguida, a associação dessas AgNPs com quitosana foi realizada para determinar se o biopolímero influenciou nas propriedades das nanopartículas e nos mecanismos de ação em células tumorais.

Durante a definição dos parâmetros para síntese verde de AgNPs, o método de extração aquosa do tubérculo de *C. longa* demonstrou ser de grande importância. O EA obtido após fervura por 3 minutos apresentou uma maior formação de AgNPs (Figura 16) em comparação com o extrato obtido após agitação por 4 horas a temperatura ambiente (Figura 15). É possível que a temperatura elevada permitiu extrair compostos em maior quantidade e/ou classes diferentes de moléculas envolvidas nos processos de síntese. A investigação do potencial do EA obtido a partir do tubérculo de *C. longa* na síntese de AgNPs já foi reportada na literatura. Shameli e colaboradores (2012; 2014) utilizaram a EA de *C. longa* sob agitação magnética por 4 horas a temperatura ambiente. Em outro estudo, Nadagouda e colaboradores (2014) avaliaram o uso de EA de *C. longa* fervido por 12 minutos para a síntese de AgNPs. Os dois grupos relataram o sucesso da síntese de AgNPs, devido à mudança de coloração das soluções contendo as AgNPs e pela observação de um pico de absorbância na faixa de 410 – 430 nm por espectrometria de luz visível. Esta técnica é amplamente utilizada para detectar a presença de NPMs. As medidas para a detecção de AgNPs são

realizadas na faixa de comprimentos de onda entre 400 e 450 nm (Mittal et al, 2013) onde é analisada a presença de um pico de absorvância. Esse pico corresponde à ressonância plasmônica de superfície (RPS) típica da formação de AgNPs a qual está relacionada ao tamanho e à forma das estruturas (Mittal et al, 2013; Bonatto e Sliva, 2014). Este fenômeno está associado à oscilação dos elétrons em superfícies metálicas após uma total reflexão da luz incidente (Liu et al, 2012). Entretanto, as condições de síntese empregadas por Nadagouda e colaboradores (2014) foram diferentes das condições utilizadas nos estudos de Shameli e colaboradores (2012; 2014) e neste presente trabalho. Portanto, não é possível comparar diretamente os dados do presente estudo com os descritos na literatura. Entretanto, observa-se que o método de extração por fervura é o mais utilizado nos trabalhos de síntese verde de NPMs (Suman et al, 2013; Mittal et al, 2013; Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014). De acordo com as metodologias encontradas na literatura, o tempo de fervura depende da escolha do próprio autor. Entretanto, é relevante lembrar que a temperatura de evaporação da água é de 100°C. Portanto, a preparação de EA fervido por muito tempo pode levar a uma perda de componentes mais voláteis que poderiam apresentar um papel importante nos processos de redução e estabilização das NPMs. Além disso, o presente estudo sugere que a centrifugação do extrato não foi suficiente para separar partículas maiores que favorecerem a formação de agregados durante o processo de síntese (Figura 15).

O presente estudo, inspirado por outros estudos realizados pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, investigou o efeito da temperatura no rendimento da síntese. Foi possível observar que o aumento da temperatura de síntese de 0 – 25 – 50 e 75 °C

induziu uma maior eficiência na formação de AgNPs. Contudo, após 24 horas de monitoramento, apenas a solução submetida à temperatura de 75 °C apresentou o pico de absorvância referente à RPS das AgNPs em suspensão (Figura 17). Este fenômeno foi bem estudado na literatura e a mesma tendência foi observada em vários trabalhos que utilizaram diversos extratos (folha, tubérculo, fruto, raiz, entre outros) (Ghosh et al, 2012; Bonatto e Silva, 2014; Velmurugan et al, 2014). Contudo, o EA de *C. longa* coletada na Índia demonstrou um grande potencial na síntese de NPMs a 25 °C, utilizando uma concentração próxima do presente estudo (Shameli et al, 2012; 2014). Os autores não testaram temperaturas mais elevadas. Em contrapartida, o presente trabalho mostrou que não houve formação de AgNPs a partir do EA de tubérculo de *C. longa* cultivada no Brasil após 24 horas de síntese a 25°C e 50°C (Figura 17). Dessa forma, uma mesma espécie cultivada em locais distintos pode apresentar um perfil fitoquímico variado em termos de quantidade de biomoléculas/metabólitos levando, conseqüentemente, a um rendimento diferente na síntese de NPMs. O trabalho de Ashraf e colaboradores (2012) investigou exatamente a variabilidade do perfil fitoquímico de *C. longa* em várias regiões da Índia e confirmou que há diferença entre as plantas de localidades diferentes. Adicionalmente, Albernaz (2014) em sua dissertação desenvolvida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia observou que folhas de *B. gaudichaudii* coletadas no verão (período úmido do Cerrado) possuem um maior potencial para formar AgNPs em comparação com as folhas coletadas no inverno (período seco do Cerrado). Portanto, o período de coleta é também de grande relevância, e pode influenciar o rendimento da síntese e as características das estruturas. Das e Brar (2013) ressaltaram que os processos de redução e estabilização das NPMs são provavelmente dependentes da ação de todas as biomoléculas

presentes no extrato utilizado. Além disso, a influência dessas biomoléculas sobre os mecanismos de síntese é própria a cada planta (Das e Brar, 2013). Portanto, os resultados do presente trabalho e os dados da literatura mostram que o perfil fitoquímico (diferença de classe e proporção de biomoléculas) da planta e da parte da planta escolhida são fatores relevantes a serem considerados no processo de síntese de NPMs.

Em seguida, foi demonstrado que a concentração do EA de *C. longa* também influenciou o rendimento da síntese. De acordo com o aumento da concentração de EA de 0,25 – 0,5 – 1 e 2 mg/mL, houve um aumento da formação de AgNPs observada pela mudança de coloração das soluções contendo as partículas e pelo pico de RPS detectado por espectrometria de luz visível (Figura 18). Shamelí e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da concentração de EA do tubérculo de *C. longa* na formação de AgNPs a 25°C. O rendimento da síntese foi maior de acordo com o aumento da concentração de EA como foi observado neste presente estudo. Albernaz (2014) também estudou a variação da concentração de EA de folhas de *B. gaudichaudii* de 10 – 20 e 50% (v/v). O melhor rendimento na síntese de AgNPs foi observado na menor concentração (10%). Em contrapartida, não houve formação de AgNPs na maior concentração (50%) devido provavelmente a uma redução muito rápida do sal precursor, levando a um processo de crescimento desordenado e resultando em partículas aglomeradas (Albernaz, 2014). Geethalakmi e Sarada (2012) observaram também que a síntese de AgNPs a partir de extrato de raiz de *Trianthema decandra* foi melhor na concentração intermediária testada. Pode-se sugerir que cada planta e parte da planta possuem biomoléculas distintas e em quantidades diferentes, o que leva a um comportamento variável durante a síntese de NPMs.

O efeito da concentração de sal precursor na eficiência de síntese de NPMs foi avaliado por alguns estudos da literatura. Apesar disso, a maioria dos trabalhos de síntese verde de AgNPs relataram a utilização de AgNO_3 na concentração padrão de 1 mM (Mittal et al, 2013). O grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva optou também para esta concentração padrão nos estudos de síntese verde realizados (Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014; Da Silva, 2014). O presente trabalho observou que a síntese de AgNPs utilizando a concentração menor de EA de *C. longa* (0,25 mg/mL) e 1 mM de AgNO_3 não apresentou uma taxa expressiva de formação de nanopartículas após 24 horas a 75°C (Figura 18). Este dado sugeriu que provavelmente ainda havia restado Ag^+ livre na solução reacional e que por isso o rendimento da síntese foi melhor com concentrações maiores de EA. Contudo, a diminuição da concentração de AgNO_3 de 0,25 e 0,5 mM, mantendo a concentração de 0,25 mg/mL de EA, não melhorou a eficiência da síntese (Figura 20). Esses dados demonstram que, dentre as concentrações de AgNO_3 testadas, o uso de 0,25 mg/ml de EA e 1 mM de AgNO_3 apresentaram o melhor rendimento na síntese após 24 horas a 75 °C. É importante ressaltar que a concentração de 0,25 mg/mL de EA foi menos eficiente na formação de AgNPs em relação à adição de maiores concentrações de EA provavelmente devido à falta de moléculas biorredutoras e estabilizantes no meio reacional. Salunke e colaboradores (2014) estudaram o efeito da concentração de sal precursor, variando de 0,1 a 5 mM, na síntese de AgNPs, AuNPs e AgAuNPs a partir de EA de raiz de *Plumbago zeylanica*. A formação de AgNPs e AuNPs foi mais eficiente utilizando a concentração máxima testada de AgNO_3 e HAuCl_4 a 5 mM. Em contrapartida, a síntese de AgAuNPs apresentou um melhor rendimento quando a concentração intermediária de 0,7 mM foi utilizada. Velmurugan e colaboradores

(2014) avaliaram o efeito da concentração de AgNO_3 (0,25 a 4 mM) na síntese de AgNPs a partir do extrato de raiz de *Z. officinale* e observaram o melhor rendimento com a concentração intermediária de AgNO_3 de 1 mM (Velmurugan et al, 2014). Esses resultados sugerem que, se há biomoléculas suficientes no extrato para agir como agentes redutores, quanto maior a disponibilidade de sal precursor melhor é o rendimento da síntese de NPMs. Contudo, um excesso de sal precursor pode inibir a formação de partículas estáveis, aumentar as aglomerações e diminuir o rendimento da síntese.

O presente trabalho relatou a influência da temperatura de armazenamento do material primário (pó de *C. longa*) na síntese de AgNPs. O tubérculo de *C. longa* armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ perdeu, ao longo dos dias, a capacidade de reduzir o AgNO_3 e produzir AgNPs (Figura 22). Este resultado pode indicar que moléculas envolvidas nos processos de síntese não foram estáveis a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Além disso, um descongelamento rápido pode levar à oxidação de moléculas reduzindo o potencial redutor do material para a síntese de AgNPs. Não foi encontrado trabalho referente ao congelamento da *C. longa* e manutenção das suas capacidades redutoras e estabilizantes para síntese verde de NPMs. Entretanto, alguns estudos demonstraram que o congelamento de folhas não interfere na formação de NPMs. A síntese de AgNPs foi realizada a partir de folhas intactas de *B. gaudichaudii* congeladas por 1 – 12 – 26 e 47 semanas. As características físicas dessas AgNPs foram avaliadas por DLS-Zeta e foi concluído que não houve diferença significativa entre as diferentes sínteses. Portanto, as folhas de *B. gaudichaudii* armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ mantiveram o potencial redutor e estabilizante (Albernaz, 2014). Essa variedade de comportamento de dois extratos expostos à mesma condição de congelamento pode ser explicada pela diferença de perfil

fitoquímico da planta e/ou parte de planta. Poucos estudos avaliam e/ou relatam, até o momento, os efeitos do congelamento do material vegetal no rendimento da síntese de NPMs.

A avaliação do efeito da presença de ar atmosférico durante a síntese de AgNPs é pouco investigada. O presente estudo demonstrou que o rendimento da síntese melhora na presença de ar atmosférico. De fato, a formação de partículas em um frasco reator, onde há um contato restrito com o ar atmosférico, ocorreu de forma mais lenta em comparação com a síntese em tubos de ensaio (Figura 23). A maioria dos estudos de síntese verde de AgNPs relatados na literatura avalia a formação de partículas na presença de ar atmosférico. Dessa forma, as moléculas presentes no ar atmosférico possuem um papel importante para a síntese de AgNPs. Entretanto, o ensaio realizado no presente estudo não permite determinar quais moléculas participam ativamente no processo de síntese. Assim, outros testes adicionais precisam ser realizados.

Resumindo os resultados encontrados no presente trabalho, a síntese verde de AgNPs a partir de EA de *C. longa* foi dependente de vários parâmetros. As melhores condições para a síntese foi: o armazenamento do material primário a temperatura ambiente, o método de extração por fervura por 3 minutos, a temperatura de síntese de 75°C, as concentrações de EA e AgNO₃ de 2mg/mL e 1mM, respectivamente, e a presença de ar atmosférico. De acordo com a literatura, cada planta, ou parte da planta utilizadas apresentam um perfil fitoquímico diferente. Portanto, essa otimização das condições de síntese é de grande relevância e deve ser investigado para cada planta empregada na síntese verde de NPMs.

O recobrimento de NPMs por polímeros é mais reportado em estudos relacionados à síntese química de que à síntese verde (Boca et al, 2011; Sanpui et al, 2011). Venkatesham e colaboradores (2012) ressaltaram que a quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados como agente estabilizante de NPMs prevenindo assim a aglomeração das estruturas. Além disso, a quitosana mostrou um grande potencial para agir como agente redutor na síntese de AgNPs (Venkatesham et al, 2012). O efeito estabilizante de tal biopolímero foi confirmado no presente estudo, com a maior estabilidade coloidal das CH-AgNPs armazenadas a temperatura ambiente em comparação com as AgNPs livres a TA (Figuras 32 e 35). O método de geleificação iônica utilizado para sintetizar as CH-AgNPs e as CH-TPP é um dos mais empregados na literatura e já se sabe que o tamanho das partículas obtidas pode variar de acordo com o grau de desacetilação da quitosana (Kumar et al, 2014).

No presente estudo, o índice de Polidispersão (PDI) das AgNPs e das CH-AgNPs foi de $0,319 \pm 0,043$ e $0,372 \pm 0,059$, respectivamente, correspondendo a uma homogeneidade moderada das estruturas de acordo com o tamanho (Malvern, 2004). Esses resultados estão de acordo com a faixa de valor de PDI encontrados na literatura para nanopartículas obtidas por sínteses verde (Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014). Uma boa homogeneidade das estruturas é importante, pois, permite uma melhor uniformidade em termo de características físicoquímicas de cada estrutura e, conseqüentemente, uma melhor uniformidade da solução contendo as AgNPs em termos de propriedade e atividade. A estabilidade coloidal de uma solução também é de grande relevância para manter a uniformidade das estruturas. Uma suspensão de nanopartículas é considerada como estável quando o valor do potencial Zeta é superior a 30 mV em módulo (Nayak et al, 2015). Portanto, as AgNPs obtidas possuem

uma moderada estabilidade coloidal por apresentar um potencial Zeta de $-24,8 \pm 2,2$ mV. Os estudos referentes à síntese de AgNPs demonstram na maioria dos casos um potencial Zeta negativo (Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014; Da Silva, 2014). Entretanto, alguns estudos relatam que as nanopartículas com um potencial Zeta neutro ou inferior a 30 mV em módulo também podem ser estáveis por vários meses. Assim, o potencial Zeta não é o único parâmetro para determinar a estabilidade coloidal das nanoestruturas, mas também é importante considerar a composição química da superfície das estruturas como, por exemplo, a presença de polímero (Venkatesham et al, 2012). As CH-AgNPs, CH-TPP e CH-AgNO₃ apresentaram uma expressiva estabilidade coloidal em termos de valores de potencial Zeta (acima de +50 mV) (Tabelas 7 e 8) podendo sugerir, no caso de CH-AgNPs, o recobrimento das AgNPs por quitosana. Boca e colaboradores (2011) observaram também um potencial Zeta positivo de +39 mV para as CH-AgNPs sintetizadas por método químico.

Em termo de estabilidade, todas as amostras armazenadas a 4°C mantiveram as suas características (Pdl, Potencial Zeta e DH) após 30 dias de avaliação. Entretanto, as AgNPs, assim como as CH-TPP, foram estáveis a TA apenas por 15 dias. Essa diferença entre o armazenamento a 4°C e TA mostrou que a temperatura influencia a estabilidade das estruturas ao longo do tempo. Este fenômeno pode estar associado às menores interações entre moléculas e/ou íons presentes em soluções quando expostas a temperaturas baixas. Em paralelo, as CH-AgNPs foram estáveis por 30 dias nas duas condições de armazenamento. A avaliação da estabilidade pode ser prolongada por mais tempo, contudo, é possível sugerir que as CH-AgNPs tendem a apresentar uma melhor estabilidade a 4°C (Figura 35). A avaliação da estabilidade de nanopartículas é pouco encontrada na literatura. Albernaz (2014) observou a

estabilidade de AgNPs obtidas a partir de EA de *B. gaudichaudii* e armazenadas a 4°C durante um ano de análise (Albernaz, 2014).

A variação de diâmetro hidrodinâmico entre as AgNPs e CH-AgNPs foi ressaltada após análises por DLS (Tabela 7). As AgNPs apresentaram uma população em distribuição em número de 105,7 nm. Em contrapartida, as CH-AgNPs apresentaram duas subpopulações, uma maior de 122,4 nm, podendo representar as AgNPs recobertas por quitosana, e uma outra de 78,82 nm, podendo corresponder às nanopartículas de quitosana livre ou nanoestruturada sem AgNPs (Figura 26). A maioria dos estudos que investigam AgNPs recobertas por polímeros não avaliam as características das AgNPs livres. Além disso, o método de DLS é pouco relatado para medir o tamanho de AgNPs.

As análises por MET são principalmente empregadas na literatura para avaliar o tamanho, assim como o formato de AgNPs. No presente estudo, foi possível observar AgNPs esféricas com diâmetro médio de $18,78 \pm 5,50$ nm (Figura 29A-B). Este resultado corroborou com outros estudos referentes às análises por MET de AgNPs sintetizadas a partir de EA de *C. longa* previamente realizados (Nadagouda et al, 2014, Shameli et al, 2014). As imagens das CH-AgNPs obtidas por MET revelaram o excesso de quitosana livre. Pode-se observar a presença de AgNPs isoladas, contudo, não há possibilidade de determinar se elas foram recobertas ou não pela quitosana, apesar de observar uma maior eletrodensidade ao redor delas (Figura 29C-D). A técnica de MFA é também frequentemente utilizada para analisar o tamanho em altura e o formato das AgNPs. Na maioria dos casos, partículas esféricas são observadas (Bonatto e Silva, 2014; Albernaz, 2014, Da Silva, 2014). Contudo, as imagens obtidas das AgNPs apresentaram partículas de $23,22 \pm 9,78$ nm, não nitidamente esféricas (Figura 28A).

Até o momento, nenhum estudo de investigação das características de AgNPs sintetizadas a partir de EA de *C. longa* por MFA foi encontrado. No presente trabalho, as CH-AgNPs analisadas por MFA apresentaram uma altura média inferior a 10 nm (Figura 28B). Foi sugerido que as imagens obtidas ilustraram o excesso de quitosana na amostra e que devido à diluição realizada, não foi possível observar AgNPs livres ou recobertas por quitosana. Dessa forma, não pode insinuar se houve ou não recobrimento das AgNPs por quitosana por essa metodologia. O tamanho observado nas análises por MFA e por MET corresponde ao diâmetro seco das AgNPs e, como esperado, foi menor em comparação ao diâmetro hidrodinâmico das AgNPs observadas por DLS-Zeta onde foi considerada a camada desolvatação.

Em paralelo às análises de caracterização, dois métodos de secagem foram empregados nas AgNPs e CH-AgNPs para determinar a influência na conservação das suas características (DH, Pdl e Potencial Zeta). As análises por DLS-Zeta demonstraram que as amostras não recuperaram as suas características. De fato, o DH e o Pdl aumentaram de forma significativa em comparação com as partículas iniciais, sugerindo uma aglomeração das partículas e uma elevada heterogeneidade em termo de tamanho de partículas (Tabela 7). O potencial Zeta foi o único parâmetro a se manter semelhante.

A síntese verde de AgNPs ocorreu de forma simples e em uma única etapa. Entretanto, os mecanismos químicos envolvidos na formação das AgNPs são complexos devido à presença de diversas biomoléculas no EA de *C. longa* tais como fenóis, terpenos, esteroides, ácidos graxos entre outros (Li et al, 2011). Essas moléculas podem interferir nos processos de redução e estabilização das partículas. Dessa forma, a avaliação das propriedades moleculares das AgNPs foi realizada

visando determinar as classes de moléculas envolvidas nos processos de síntese das AgNPs.

A técnica de FTIR é amplamente utilizada para investigar os grupos de moléculas que compõem as NPMs sintetizadas a partir de extrato vegetal. As AgNPs e o EA de *C. longa* investigados por Shameli e colaboradores (2014) apresentaram um perfil muito semelhante em comparação com o presente estudo. Os autores demonstraram a presença de picos e bandas referentes a grupamentos encontrados em compostos heterocíclicos tais como alcaloides e flavonoides (Shameli et al, 2014). No presente estudo, foi possível observar uma banda de maior intensidade em 3370 cm^{-1} característica do grupamento hidroxila (OH) presente em água. As bandas em 1643 e 1030 cm^{-1} são típicas de estiramento carbonila C=O e C-O-H de grupos aldeído, cetona e ácido carboxílico presente em compostos fenólicos, terpenoides e ácidos graxos (Li et al, 2011). O levantamento realizado por Li e colaboradores (2011) confirma a presença desses grupos funcionais no extrato de *C. longa*. A banda em 1311 cm^{-1} observada apenas no extrato representa o estiramento C-O de compostos fenólicos. A ausência desta banda no espectro de AgNPs pode significar que esses compostos estavam relacionados à formação das nanopartículas. Entretanto, é possível observar uma banda de alta intensidade em 1384 cm^{-1} no espectro de AgNPs. A ausência da banda em 1311 cm^{-1} pode ser devido à presença desta nova banda de maior intensidade. Apesar da grande semelhança entre as amostras, o espectro das AgNPs apresenta duas bandas ausentes no extrato mas presentes no AgNO_3 em 1384 e 830 cm^{-1} típicos de estiramento N-O e N=O de NO_3 (Santos e al, 2005). Portanto, essas bandas estão atribuídas ao NO_3^- residual da solução de AgNO_3 utilizada durante a síntese de AgNPs (Figura 41). Em paralelo, ao observar a figura 42, foi possível ressaltar

a presença de uma banda no espectro das CH-AgNPs a 1384 cm^{-1} . É possível notar que esta banda está ausente no espectro das CH-TPP, entretanto, está presente no espectro das AgNPs e corresponde ao NO_3^- residual da solução de AgNO_3 utilizada durante a síntese de AgNPs. Portanto, esta técnica confirmou a presença das AgNPs nas amostras de CH-AgNPs.

O método de espectrometria de massa MALDI/TOF é uma técnica robusta, porém ainda pouco utilizada para investigar as propriedades moleculares de AgNPs sintetizadas por síntese verde. O presente trabalho observou apenas uma diferença entre os espectros de AgNPs com os controles extrato e AgNO_3 que foi o surgimento de dois picos a m/z 485,0 e 487,0. A ausência desses picos para os controles sugere que a associação do extrato com o AgNO_3 leva à redução da prata e, conseqüentemente, à oxidação de algumas moléculas do extrato (Figura 43).

Similarmente Bonatto e Silva (2014) observaram esses picos no espectro de AgNPs sintetizadas a partir de EA de frutos (castanhas) de *A. occidentale*. Contudo, esses picos também foram observados no espectro do extrato em menor intensidade e, portanto, foi possível determinar a ligação entre as moléculas do extrato e a formação de AgNPs.

Em resumo, a caracterização das diferentes estruturas avaliada por vários métodos é de grande importância para determinar a consistência dos resultados. Portanto, o diâmetro hidrodinâmico e o diâmetro seco foram avaliados, respectivamente, por DLS e por métodos de microscopia (MET e MFA) e os resultados corroboraram com os dados da literatura. As técnicas de microscopia também permitiram determinar a forma das estruturas. Além disso, esses métodos não possibilitaram a confirmação ou não do recobrimento das AgNPs por quitosana, mas, permitiram observar que houve um excesso de polímero na amostra. Por fim, as

análises por FTIR e espectrometria de massa MALDI/TOF confirmaram que grupos de moléculas da *C. longa* foram envolvidos nos processos de redução e estabilização das AgNPs.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* representam estudos primordiais para entender os efeitos e os mecanismos de ação de novos nanomateriais sintetizados. Essa etapa é de grande relevância e corresponde ao primeiro passo da investigação da nanotoxicidade. O ensaio de viabilidade celular é um dos primeiros passos para investigar a toxicidade de um material na área da saúde. As AgNPs e CH-AgNPs obtidas no presente estudo apresentaram atividade dose-dependente contra as células de CE (A431) após 24 horas de exposição. Apesar de ter demonstrado um papel importante na estabilidade das AgNPs, a quitosana associada às AgNPs não demonstrou possuir uma ação citotóxica diferente em comparação com as AgNPs livres *in vitro*. De fato, as CH-AgNPs apresentaram uma atividade semelhante (dose dependente) à das AgNPs contra as linhagens A431 e HaCAT (Figuras 44 e 45). As CH-AgNPs sintetizadas por Boca e colaboradores (2011) demonstraram também uma atividade dose-dependente contra células de câncer de pulmão não pequenas NCI-H460. Contudo, as AgNPs livres não foram avaliadas para determinar a influência da quitosana na atividade citotóxica (Boca et al, 2011). Estudos relataram que a presença da quitosana em outros tipos de nanossistemas pode melhorar a solubilidade de fármacos e a sua absorção cutânea (Sezer e Cevher, 2012; Popat et al, 2014). Além disso, AgNPs sintetizadas por método químico e associadas à quitosana demonstraram uma atividade citotóxica contra vários tipos de cânceres. Em contrapartida, não foi avaliado a atividade antitumoral das AgNPs livres (Sanpui et al, 2011; Boca et al, 2011).

Até o momento, não foi encontrado estudo relacionado à atividade antitumoral em linhagem de CE (A431) de AgNPs e CH-AgNPs obtidas a partir de *C. longa*. Contudo, Nayak e colaboradores (2015) investigaram a atividade antitumoral de AgNPs obtidas via síntese verde a partir de extratos aquosos de *Cucurbita maxima* (pétalas), *Moringa oleifera* (folhas) e *Acorus calamus* (rizoma) em linhagem de CE (A431). A atividade citotóxica dose-dependente também foi observada para essas AgNPs após 48 horas de exposição (Nayak et al, 2015).

A atividade das CH-TPP (sem presença de AgNPs) também foi investigada no presente trabalho, e as estruturas não demonstraram efeito tóxico em células tumorais e não tumorais (Figuras 44 e 45). Neste caso, são escassas informações referentes a avaliação da atividade e das características das CH-TPP sem a presença de medicamento apesar do seu emprego frequente como nanocarreador de medicamentos anticancerígenos tais como 5-FU, doxorubicina, docetaxel e curcumina, entre outros (Kumar et al, 2014). Popat e colaboradores (2014) mostraram que as características das CH-TPP variam com a presença da curcumina e que a sua atividade depende da liberação do medicamento (Popat et al, 2014). Portanto, as características e a atividade biológica das CH-TPP são associadas à presença e à liberação do fármaco. Alguns estudos reportaram a atividade antitumoral da quitosana livre, mas os mecanismos de ação ainda não são bem entendidos (Philippi et al, 2012, Gibot et al, 2014).

Existem poucos estudos relacionados à síntese verde de AgNPs onde relatam a atividade do extrato e do sal precursor utilizados. Os resultados do presente trabalho mostraram que o EA estoque de *C. longa* diminuiu a viabilidade celular de até 30% na

maior das concentrações testadas (80µM) mas não foi observada no EA mantido a 75°C por 24 horas. Este resultado mostra que a atividade citotóxica do EA de *C. longa* é prejudicada quando o material é aquecido por um longo período. Pode-se sugerir que alguns compostos envolvidos na atividade antitumoral são termossensíveis. Thongrakard e colaboradores (2014) relataram que o EA de *C. longa* demonstrou uma atividade antitumoral em células de CE (A431) parecida com a atividade da curcumina isolada, diminuindo a proliferação celular de aproximadamente 40% e levando à morte celular por apoptose e autofagia das células tumorais (Thongrakard et al, 2014). Vários estudos de síntese verde reportaram que o extrato vegetal pode ou não apresentar atividade anticancerígena em diferentes tipos de câncer, *in vitro* (Rajkuberan et al, 2014, Krishnaraj et al, 2014, Nakkala et al, 2015). De acordo com a literatura, cada extrato apresenta atividade distinta, provavelmente, relacionado ao perfil fitoquímico da planta e do tipo de linhagem celular escolhida.

A maioria dos estudos que investigam a atividade citotóxica de AgNPs não apresentam dados referentes à citotoxicidade em células normais. Contudo, alguns estudos demonstraram que as AgNPs sintetizadas por síntese química ou por síntese biológica apresentam tanto citotoxicidade para células tumorais como para células não tumorais (AshaRani et al, 2009; Albernaz, 2014). O presente estudo relatou a atividade citotóxica não específica das AgNPs e CH-AgNPs obtidas. De fato, as estruturas demonstraram uma atividade citotóxica contra as células de CE (A431), mas também contra as células de queratinócitos normais (HaCAT) após 24 horas de exposição.

Em contrapartida, alguns estudos reportaram o efeito quimo-preventivo de AgNPs obtidas por síntese química contra os danos causados pelos raios UVB em

queratinócitos (HaCAT) *in vitro* (Arora et al, 2015; Palanki et al, 2015). O efeito das AgNPs após exposição a raios UVB está, provavelmente, associado às propriedades ópticas únicas das estruturas. Essas informações são de grande relevância e abrem várias perguntas a respeito da aplicação das AgNPs sintetizadas no presente trabalho. Várias investigações seriam interessantes para determinar se, na exposição de raios UVB, as AgNPs manteriam a sua atividade antitumoral contra as células de CE e agiriam como agente preventivo para as células de queratinócitos. Adicionalmente, precisa-se determinar se a presença da quitosana interferiria ou não nessas atividades.

A síntese química de AgNPs e seus efeitos citotóxicos suscitou um número maior de investigações a respeito dos mecanismos de ação em células tumorais. Esses efeitos avaliados são geralmente o estresse oxidativo, a lesão de membrana, a fragmentação de DNA, a variação do potencial de membrana mitocondrial, a ativação de via como caspase-3, a morte celular por apoptose e/ou necrose entre outros (Foldbjerg et al, 2011; Ávalos et al, 2012). Além disso, a síntese verde de NPMs é relativamente recente. Dessa forma, a maioria dos estudos encontrados investigaram principalmente a otimização da síntese e a caracterização das estruturas. Portanto, poucos estudos de síntese verde avaliaram os mecanismos de ação das NPMs em células tumorais.

No presente estudo, o AgNO₃ exposto às células de CE-A431 na concentração de 50 µM apresentou a maior atividade citotóxica após 24 horas de exposição. Pode-se observar que logo após o tratamento, as células expostas ao AgNO₃ sofreram mudança drástica de morfologia (Figura 48), além de apresentarem 100 % de membrana lesionada (Figura 46). Por definição, a morte celular por necrose é relacionada a lesões prematuras causadas por fatores externos e é caracterizada pela ruptura da

membrana plasmática resultando no vazamento do conteúdo citoplasmático no meio extracelular (Pattani et al, 2015). Portanto, esses resultados sugerem que o AgNO_3 induziu morte celular por necrose. Adicionalmente, as análises por Citometria de fluxo demonstraram uma dupla marcação por Anexina-V e Iodeto de propídeo (PI) e o aumento da fragmentação de DNA de quase 100%. Além disso, foi possível observar a diminuição da proliferação celular, uma parada das células em fase G1 do ciclo celular e um aumento do potencial de membrana mitocondrial (Figuras 47, 51 e 52).

Em paralelo, as AgNPs e CH-AgNPs demonstraram uma atividade diferente do AgNO_3 livre na mesma concentração. De fato, não foi observado mudança na morfologia das células de CE-A431 após 24 horas de exposição (Figura 48), e apenas 53,4% e 43,4 % das células apresentaram lesão de membrana após tratamento, respectivamente (Figura 46). Além disso, as análises realizadas permitiram observar uma diminuição da proliferação celular e um aumento da fragmentação de DNA e do potencial de membrana mitocondrial, sugerindo uma hiperpolarização da membrana mitocondrial. A hiperpolarização da membrana mitocondrial ocorre quando há um acúmulo de carga negativa no interior da mitocôndria devido, provavelmente, ao fechamento de canais iônicos impedindo a entrada de íons sódio (Na^+). Este fenômeno leva à ruptura da membrana mitocondrial liberando sinalizadores pró-apoptóticos e levando à morte celular por apoptose (Ly et al, 2003). A maioria das células expostas às CH-AgNPs apresentaram uma simples marcação por Anexina-V sugerindo exposição das fosfatidilserinas, indicativo de morte celular por apoptose, enquanto a maioria das células expostas às AgNPs apresentaram uma dupla marcação por Anexina-V e PI sugerindo morte celular por apoptose tardia ou necrose (Figura 56). Além disso, as CH-AgNPs levaram à parada das células na fase G1 do ciclo celular, sugerindo o bloqueio

da proliferação celular. O mecanismo de morte celular por apoptose é um processo normal das células envolvendo vias de sinalização intracelulares, receptores extracelulares e a mitocôndria (Pattani et al, 2015). Austin e colaboradores (2014) relataram que a fragmentação de DNA representa também um índice de morte celular por apoptose. Portanto, com base nesses dados, é difícil determinar com precisão qual foi o mecanismo de morte celular após exposição às AgNPs. Entretanto, pode-se sugerir que as CH-AgNPs induziram morte celular por apoptose. Devido à diferença de atividade entre as AgNPs e CH-AgNPs, pode-se sugerir que a presença da quitosana influenciou na atividade citotóxica. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para determinar com mais clareza o mecanismo ação das AgNPs e CH-AgNPs.

No presente trabalho, os dados de mecanismo de ação são mais sugestivos de morte celular por apoptose, principalmente para as células tratadas por CH-AgNPs. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar tal efeito.

As AgNPs obtidas a partir de casca de caule de *Moringa oleífera* induziram estresse oxidativo e morte celular por apoptose em células HeLa (Vasanth et al, 2014). Gurunathan e colaboradores (2013) reportaram que as AgNPs obtidas a partir de extrato de cogumelo (*Ganoderma neo-japonicum*) induziram diminuição da viabilidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio, lesão de membrana, fragmentação de DNA e ativação da via da caspase-3 em células tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231) (Gurunathan et al, 2013). Govindaraju e colaboradores (2015) demonstraram a fragmentação de DNA e morte celular por apoptose devido às AgNPs sintetizadas a partir de extrato de alga *Sargassum vulgare*. Esses dados revelaram que, independentemente do tipo de síntese e do tipo de organismo biológico utilizados

para a síntese de AgNPs, as estruturas apresentaram atividade citotóxica e genotóxica em células tumorais de diversas linhagens.

Neste caso, não é possível afirmar se a atividade citotóxica das AgNPs e CH-AgNPs foi direta, com a penetração e liberação dos íons Ag^+ no citoplasma das células, ou se a atividade foi indireta, com a ativação de mecanismos de morte celular devido à presença de íons Ag^+ no meio extracelular. A penetração das nanopartículas dentro das células eucarióticas geralmente é possível por endocitose ou por difusão passiva. Esses dois métodos são dependentes das propriedades das nanopartículas tais como tamanho, forma, composição química entre outros (Lévy et al, 2010). A partir do método de eletroporação, a penetração de AgNPs sintetizadas quimicamente foi observada em células tronco de carcinoma nasofaríngeo (C666), células de linfoma de Burkitt (CA46) e células de CE (A431). As AgNPs se acumularam no citoplasma das células, e por difusão passiva (sem uso de eletroporação) as AgNPs foram capazes de entrar no núcleo (Lin et al, 2009).

Em estudos relacionados à pele, a hipótese é que as AgNPs penetrariam via intercelular, transcelular e/ou transnexal, dependendo das propriedades das nanopartículas, e se acumulariam na junção epiderme-derme. (Liang et al, 2013; Labouta et al, 2013). Dessa forma, o mecanismo de ação das AgNPs nas células eucariotas ainda não é bem entendido e mais investigações precisam ser realizadas tanto em células tumorais quanto em células não tumorais.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- 1- A síntese de AgNPs a partir de EA de *C. longa* depende de vários parâmetros e as condições otimizadas foram: o armazenamento do tubérculo (seco e triturado) de *C. longa* a temperatura ambiente, protegida da luz; a extração aquosa por fervura durante 3 minutos; a temperatura de síntese a 75°C por 24 horas e as concentrações EA e AgNO₃ de 2 mg/mL e 1 mM, respectivamente.
- 2- As AgNPs sintetizadas nas condições otimizadas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico em número de partículas de 105,6 ± 45,5 nm e um diâmetro hidrodinâmico médio (*z-average*) de 210,3 ± 57,1 nm. As estruturas demonstraram uma homogeneidade moderada com um Pdl de 0,319 ± 0,043 e uma estabilidade coloidal moderada de acordo com o potencial Zeta de - 24,8 ± 2,2 mV. A secagem das AgNPs por liofilização ou centrífugo (tipo Speed-vac®) não permitiu manter essas propriedades iniciais após a reidratação do material.
- 3- A caracterização das AgNPs por MFA e MET mostrou partículas homogêneas esféricas, formato visível principalmente por MET. O tamanho seco das AgNPs foi de 23,22 ± 9,78 nm e 20 nm, respectivamente.
- 4- As CH-AgNPs apresentaram um diâmetro hidrodinâmico em número de partículas de 110,9 ± 38,0 nm e um diâmetro hidrodinâmico médio (*z-average*) de 328,0 ± 61,6 nm. As estruturas demonstraram uma homogeneidade moderada com um Pdl de 0,372 ± 0,059 e uma boa estabilidade coloidal de acordo com o potencial Zeta de 53,9 ± 3,1 mV.
- 5- As análises das CH-AgNPs por MFA e MET permitiram observar que a proporção de quitosana utilizada foi muito maior em comparação com a quantidade de AgNPs o que levou à formação de nanoestruturas de quitosana sem AgNPs e à presença de quitosana livre.

- 6- As AgNPs armazenadas a 4°C apresentaram uma melhor estabilidade ao longo dos 30 dias de monitoramento. As AgNPs mantidas a temperatura ambiente foram estáveis apenas por 15 dias. As CH-AgNPs demonstraram uma estabilidade por 30 dias tanto a 4°C quanto a temperatura ambiente.
- 7- As análises por FTIR e espectrometria de massa MALDI/TOF permitiram observar um perfil molecular distinto para as AgNPs. Os principais grupamentos encontrados nas análises por FTIR foram C=O e C-O-H de grupos aldeído, cetona e ácido carboxílico presente em compostos fenólicos, terpenoides e ácidos graxos.
- 8- As AgNPs e CH-AgNPs apresentaram, *in vitro*, uma atividade citotóxica não específica e dose dependente contra a linhagem de células cancerígenas de CE (A431) e contra a linhagem de células normais de queratinócitos (HaCAT) após 24 horas de exposição nas concentrações de 20 – 40 – 50 – 60 e 80 µM, referente à concentração de AgNO₃.
- 9- As AgNPs foram capazes de induzir lesão de membrana plasmática, diminuir a proliferação celular, aumentar a taxa de DNA fragmentado, aumentar o potencial de membrana mitocondrial após 24 horas de exposição a 50 µM.
- 10- As CH-AgNPs foram capazes de induzir lesão de membrana plasmática, diminuir a proliferação celular, aumentar a taxa de DNA fragmentado, aumentar a proporção de células em fase G1 do ciclo celular, aumentar o potencial de membrana mitocondrial e induzir morte celular por apoptose após 24 horas de exposição a 50 µM.
- 11- Os mecanismos de ação das AgNPs e CH-AgNPs foram muito similares entre si, contudo, os testes estatísticos realizados demonstraram que o aumento do potencial de membrana mitocondrial, o bloqueio das células em fase G1 do ciclo celular e a marcação por Anexina-V após exposição às CH-AgNPs foram significativamente diferentes em comparação com a exposição às AgNPs,

sugerindo que a presença da quitosana pode influenciar essa atividade citotóxica.

8 PERSPECTIVAS

A dosagem da prata livre permitiria associar a taxa de síntese com a atividade biológica em células de CE (A431) e queratinócitos (HaCAT);

A biodistribuição da AgNPs e CH-AgNPs em células eucarióticas poderia ser realizada a partir de análises por MET ou outro tipo de microscopia tais como microscopia confocal;

Os mecanismos de ação das AgNPs e CH-AgNPs poderiam ser avaliados em células normais (HaCAT);

Outros testes poderiam ser investigados para entender melhor os mecanismos de ação tais como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a ativação da via da caspase-3 entre outros;

Os efeitos das AgNPs e CH-AgNPs poderiam ser investigados *in vivo*;

As AgNPs e CH-AgNPs poderiam ser associadas a um creme ou pomada para futura aplicação tópica.

9 REFERÊNCIAS

ABBASI, T.; ANURADHA, J.S.U. and ABBASI, G.S.A, 2014. Gainful utilization of the highly intransigent weed ipomoea in the synthesis of gold nanoparticles. *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), pp.15–22.

ACCARDI, R. and GHEIT, T., 2014. Cutaneous HPV and skin cancer. *La Presse Médicale*, 43(12), pp.e435–e443.

AKHTAR, M.S.; PANWAR, J. and YUN, Y.S., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), pp.346–56.

ALBERNAZ, V.L., 2014. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. 122p. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Nanobiotecnologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

ARORA, S.; JAIN, J.; RAJWADE, J. M. and PAKNIKAR, K. M., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2), pp.93–100.

ARORA, S., TYAGI, N., BHARDWAJ, A., RUSU, L., PALANKI, R., VIG, K., SINGH, S.R., SINGH, A.P., PALANKI, S., MILLER, M.E., CARTER, J.E. and SINGH, S., 2015. Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potencial for prevention of skin carcinogenesis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 11, 1265-1275.

ARVIZO, R.R.; SOUNIK, S.; ENFENG, W.; DAVID, R.J. and RESHAM, B., 2013. Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle.

ASHARANI, P V; MUN, G.L.K.; PRAKASH, H.M. and SURESH, V., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells - SOM. *ACS nano*, 3(2), pp.279–290.

ASHRAF, K., MUJEEB, M., AHMAD, A., AMIR, M., MALLICK, M.N. and SHARMA, D., 2012. Validated HPTLC analysis method for quantification of variability in content of curcumin in *Curcuma longa* L (turmeric) collected from different geographical region of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S584-S588.

ÁVALOS, A., HAZA, A.I., MATEO, D. and MORALES, P., 2012. In vitro evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 10.3109/15376516.2012.762081.

BAHNER, J.D. and BORDEAUX, J.S., 2013. Non-melanoma skin cancers: Photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31(6), pp.792–798.

BAI, C. and LIU, M., 2013. From Chemistry to Nanoscience: Not Just a Matter of Size.

Angewandte Chemie International Edition, 52(10), pp.2678–2683.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A. and DÜNNHAUPT, S., 2012. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3), pp.463–469.

BOCA, S.C.; POTARA, M.; GABUDEAN, A.M.; JUHEM, A.; BALDECK, P.L. and ASTILEAN, S., 2011. Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. *Cancer Letters*, 311(2), pp.131–140.

BONATTO, C.C.; SILVA, L.P., 2014. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. *Industrial Crops and Products* 58, 46–54.

CHINEMBIRI, T.; DU PLESSIS, L.; GERBER, M.; HAMMAN, J. and DU PLESSIS, J., 2014. *Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment*.

CHOW, E.K.-H. and HO, D., 2013. Cancer nanomedicine: from drug delivery to imaging. *Science translational medicine*, 5(216), pp.1–12.

CHOWDHURY, I.H.; GHOSH, S.; ROY, M. and NASKAR, M.K., 2014. Green synthesis of water-dispersible silver nanoparticles at room temperature using green carambola (star fruit) extract. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 73(1), pp.199–207.

CONDE, J., DORIA, G. and BAPTISTA, P., 2012. Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer. *Journal of Drug Delivery*, 2012, pp.1–12.

D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A. and SCOTT, T., 2013. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp.12222–12248.

DA SILVA, L.D., 2014. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira). 101p. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Nanobiotecnologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

DAS, R.K. and BRAR, S.K., 2013. Plant mediated green synthesis: modified approaches. *Nanoscale*, 5, pp.10155–62.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M. and CHIELLINI, E., 2011. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), pp.981–1014.

DIANZANI, C.; ZARA, G.P.; MAINA, G.; PETTAZZONI, P.; PIZZIMENTI, S.; ROSSI, F.; GIGLIOTTI, C.L.; CIAMPORCERO, E.S.; DAGA, M. and BARRERA, G., 2014. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *BioMed research international*, 2014, p.895986.

DIAS, K.B.; PEREIRA, D.; FERREIRA, L.A.; RIBEIRO, R.; COSTA, L.; SCHEIDT, L.D and NEWTON, G., 2013. Chitin and chitosan : Characteristics , uses and production current perspectives Quitina e quitosana : Características , perspectivas atuais de produção utilizações. *Journal of biotechnology and biodiversity*, 4(3), pp.184–191.

DREXLER, K.E., 1981. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), pp.5275–5278.

DUNCAN, B.B.; CHOR, D.; AQUINO, E.M.L. and BENSENOR, I.M., 2012. Chronic Non-Communicable Diseases in Brazil : priorities for disease management and resear. *Rev Saúde Pública*, 46, pp.126–134.

FÁBREGAS, A., MIÑARRO, M., GRACÍA-MONTOYA, E., PÉREZ-LOZANO, P., CARRILLO, C., SARRATE, R., SÁNCHEZ, N., TICÓ, J.R. and SUÑÉ-NEGRE, J.M. 2013. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 446, Issues 1–2, 25, Pages 199–204.

FARADAY, M., 1857. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147(0), pp.145–181.

FARAMARZI, M.A. and SADIGHI, A., 2013. Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 189-190, pp.1–20.

FERRARI, M., 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), pp.161–171.

FERREIRA, D.M.; SAGA, Y.Y.; ALUICIO-SARDUY, E. and TEDESCO, A.C., 2013. Chitosan nanoparticles for melanoma cancer treatment by Photodynamic Therapy and electrochemotherapy using aminolevulinic acid derivatives. *Curr Med Chem*, 20(14), pp.1904–1911.

FOLDBJERG, R., DANG, D.A. and AUTRUP, H., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*, 85:743-750.

GUPTA, S.C., KISMALI, G. and AGGARWAL, B.B., 2013. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *BioFactors*, 39(1), pp.2–13.

GEETHALAKMI, R. and SARADA, D.V.L., 2012. Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 7 5375-5384.

GHOSH, S., PATIL, S., AHIRE, M., KITTURE, R., KALE, S., PARDESI, K., CAMEOTRA, S.S., BELLARE, J., DHAVALE, D.D., JABGUNDE, A. and CHOPADEV, B.A., 2012. Synthesis of

silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International Journal of Nanomedicine*, 7 483-496.

GIBOT, L., CHABAUD, S., BOUHOUT, S., BOLDUC, S., AUGER, F.A. and MOULIN, V.J., 2015. Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 370-379.

GOVINDARAJU, K., KRISHNAMOORTHY, K., ALSAGABY, S.A., SINGARAVELU, G. and PREMANATHAN, M., 2015. Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells. *The Institution of Engineering and Technology Nanobiotechnology*, Vol. 9, Iss. 6, pp.325-330.

GURUNATHAN, S. RAMAN, J., MALEK, S.N.A., JOHN, P.A. and VIKINESWARY, S., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imawzeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* 8 4399-4413.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.

IBRAHIM, H.M.M., 2015. ScienceDirect Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, (February), pp.1–11.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil), Rio de Janeiro, disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma, acessado em dezembro de 2015.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil) Estimativa 2015: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2015/, acessado em dezembro de 2015.

INGALE, A.G., 2013. Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an ecofriendly approach. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4(2).

IRAVANI, S., 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13, p.2638.

ISMAIL, E.H.; KHALIL, M.MH.; SEIFF.A.AL. and EL-MAGDOUB, F., 2014. Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Extract of Grape (*Vitis Vinifera*) Leaves and Seeds. *Progress in Nanotechnology and Nanomaterials*, 3, pp.1–12.

JEYARAJ, M.; SATHISHKUMAR, G.; SIVANANDHAN, G.; MUBARAKALI, D.; RAJESH, M.; ARUN, R.; KAPILDEV, G.; MANICKAVASAGAM, M.; THAJUDDIN, N.; PREMKUMAR, K.

- and GANAPATHI, A., 2013. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106(July 2015), pp.86–92.
- KALLINI, J.R., HAMED, N. and KHACHEMOUNE, A., 2015. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. *International Journal of Dermatology*, 54(2), pp.130–140.
- KHARISSOVA, O.V.; DIAS, H.V.R.; KHARISOV, B.I.; PÉREZ, B.O. and PÉREZ, V.M.J., 2013. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), pp.240–248.
- KHOLOUD, M.M., EL-NOUR, A., EFTAIHA, A., AL-WARTHAN, A. and AMMAR, R.A.A., 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), pp.135–140.
- KORINTH, G. and DREXLER, H., 2013. *Penetration of Nanoparticles through Intact and Compromised Skin*,
- KRISHNARAJ, C., MUTHUKUMARAN, P., RAMACHANDRAN, R., BALAKUMARAN, M.D. and KALAICHELVAN, P.T., 2014. *Acalypha indica* Linn: Biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles and their cytotoxic effects against MDA-MB-231, human breast cancer cells. *Biotechnology Reports* 4, 42-49.
- KUMAR, R.; ROOPAN, S.M.; PRABHAKARN, A.; KHANNA, V.G. and CHAKROBORTY, S., 2012. Agricultural waste *Annona squamosa* peel extract: Biosynthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90, pp.173–176.
- KUMAR, V., YADAV, S.C. and YADAV, S.K., 2010. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(10), pp.1301–1309.
- KUMAR, N., PATEL, A.K., KUMARI, N. and KUMAR, A., 2014. A review on chitosan nanoparticles for cancer treatment. *International of Nanomaterials and Biostructures*, 4(4):63-65.
- LABOUTA, H.I. and SCHNEIDER, M., 2013. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9, 39-54.
- LACY, K. and ALWAN, W., 2013. Skin cancer. *Medicine*, 41(7), pp.402–405.
- LEMBO, D. and CAVALLI, R., 2010. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21(2), pp.53–70.
- LI, S.; YUAN, W.; DENG, G.; WANG, P.; YANG, P. and AGGARWAL, B.B., 2011. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*, 2, pp.28–54.

LY, J.D.; GRUBB, D.R. and LAWEN, A., 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003; 8: 115–128.

MADAN, V., LEAR, J.T. and SZEIMIES, R., 2010. Non-melanoma skin cancer. *The Lancet*, 375(9715), pp.673–685.

MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. User Manuals, England, 2004.

Disponível em:

http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf. Acesso em novembro de 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. 2011. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011 - 2022. Brasília: Ministério da Saúde. 148 p.: IL. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

MISAK, H.; ZACHARIAS, N.; SONG, Z.; HWANG, S.; MAN, K-P.; ASMATULU, R. and YANG, S-Y., 2013. Skin cancer treatment by albumin/5-Fu loaded magnetic nanocomposite spheres in a mouse model. *Journal of biotechnology*, 164(1), pp.130–6.

MITTAL, A.K., CHISTI, Y. and BANERJEE, U.C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), pp.346–356.

MOGHIMI, S.M., 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19(3), pp.311–330.

NADAGOUDA, M.N.; IYANNA, N.; LALLEY, J.; HAN, C.; DIONYSIOU, D.D. and VARMA, R.S., 2014. Synthesis of silver and gold nanoparticles using antioxidants from blackberry, blueberry, pomegranate, and turmeric extracts. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2, pp.1717–1723.

NAKKALA, J.R.; MATA, R.; BHAGAT, E. and SADRAS, S.R., 2015. Green synthesis of silver and gold nanoparticles from *Gymnema sylvestre* leaf extract: study of antioxidant and anticancer activities. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(3), p.151.

NAYAK, D.; PRADHAN, S.; ASHE, S.; RAUTA, P.R. and NAYAK, B., 2015. Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431 carcinoma. *Journal of Colloid and Interface Science*, 457, pp.329–338.

NEVILLE, J.A., WELCH, E., and LEFFELL, D.J. (2007). Management of nonmelanoma skin cancer in 2007. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4, 462–469.

NINDL, I., STOCKFLETH, E. and HOFMANN, T.G., 2013. Report on the 6th International Conference of HPV, Polyomavirus, and UV Radiation in Skin Cancer. *The Journal of investigative dermatology*, 133(7), pp.1702–5.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ P.L.F. and LOPES, C., 2007. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(4), pp.593–616.

ONG, C.; LIM, J.Z.Z.; NG, C-T.; LI, J.J.; YUNG, L-Y.L. and BAY, B-H.I., 2013. Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. *Current medicinal chemistry*, 20(6), pp.772–81.

Organização Mundial da Saúde, 2012 <http://www.who.int/en/>

PALANKI, R., AROA, S., TYAGI, N. RUSU, L., SINGH, A.P., PALANKI, S., CARTER, J.E. and SINGH, S., 2015. Size is an essential parameter in governing the UVB-protective efficacy of silver nanoparticles in human keratinocytes. *BMC Cancer* 15:636.

PARIKH, S.A., PATEL, V.A. and RATNER, D., 2014. Advances in the management of cutaneous squamous cell carcinoma. *F1000prime reports*, 6(August), p.70.

PARK, S.N., JO, N.R. and JEON, S.H., 2014. Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, pp.1481–1485.

PARVEEN, S.; MISRA, R. and SAHOO, S.K., 2011. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, 8(2), pp.147–166.

PAULKUMAR, K.; GNANAJOBITHA, G.; VANAJA, M.; RAJESHKUMAR, S.; MALARKODI, C.; PANDIAN, K. and ANNADURAI, G., 2014. Piper nigrum leaf and stem assisted green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against agricultural plant pathogens. *TheScientificWorldJournal*, 2014, p.829894.

PHILIPPI, C., LORETZ, B., SCHAEFER, U.F. and LEHR, C.M., 2012. Application of chitosan for anticancer biopharmaceutical delivery. In: Wiley, J. and Sons, Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics. First edition, 2012, 381-392.

POPAT, A.; KARMAKAR, S.; JAMBHRUNKAR, S.; XU, C. and YU, C., 2014. Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, pp.520–527.

PRASAD, S. and AGGARWAL, B.B., 2011. Turmeric, the Golden Spice from Traditional Medicine to Modern Medicine.

RAJKUBERAN, C.; SUDHA, K.; SATHISHKUMAR, G. and SIVARAMAKRISHNAN, S., 2015. Antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using latex of *Calotropis gigantea* L. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, pp.924–930.

RATHI SRE, P.R.; REKA, M.; POOVAZHAGI, R.; ARUL KUMAR, M. and MURUGESAN, K., 2015. Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, pp.1137–1144.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A.; DAWSON, K. and LYNCH, I., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials*, 6(6), pp.2295–2350.

ROOPAN, S.M.; BHARATHI, A.; KUMAR, R.; KHANNA, VENKATESH G. and PRABHAKARN, A., 2012. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of aqueous extract of *Annona squamosa* L peel as biomaterial for the reduction of palladium salts into nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, pp.209–212.

ROOPAN, S.M.; BHARATHI, A.; PRABHAKARN, A.; ABDUL R.A.; VELAYUTHAM, K.; RAJAKUMAR, G.; PADMAJA, R. D.; LEKSHMI, M. and MADHUMITHA, G., 2012. Efficient phyto-synthesis and structural characterization of rutile TiO₂ nanoparticles using *Annona squamosa* peel extract. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98, pp.86–90.

SALIMATH, S.; VENKATESHA, J.; KULKARNI, S. and SHETTY, G.R., 2014. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivars for growth and yield in southern dry zone of Karnataka. pp.15–18.

SALUNKE, G.R.; GHOSH, S.; SANTOSH KUMAR, R.J.; KHADE, S.; VASHISTH, P.; KALE, T.; CHOPADE, S.; PRUTHI, V.; KUNDU, G.; BELLARE, J.R. and CHOPADE, B.A., 2014. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *International journal of nanomedicine*, 9(1), pp.2635–53.

SANPUI, P., CHATTOPADHYAY, A. and GHOSH, S.S., 2011. Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using Chitosan nanocarrier. *American Chemical Society, Appl. Mater. Interfaces* 3, 218-228.

SARASWATHI, B., BALAJI, A. and UMASHANKAR, M.S., 2013. Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, pp.423–430.

SATHISHKUMAR, M., SNEHA, K. and YUN, Y.-S., 2010. Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource Technology*, 101(20), pp.7958–7965.

Schaefer, H.E., 2010. *Nanoscience*,

SEZER, A. and CEVHER, E., 2012. Topical drug delivery using chitosan nano-and microparticles. *Expert opinion on drug delivery*, pp.1129–1146.

SHAMELI, K.; AHMAD, M.B.; SHABANZADEH, P.; AL-MULLA, E.A.J.; ZAMANIAN, A.; ABDOLLAHI, Y.; JAZAYERI, S.D.; EILI, M.; JALILIAN, F.A. and HAROUN, R.Z., 2014. Effect of Curcuma longa tuber powder extract on size of silver nanoparticles prepared by green method. *Research on Chemical Intermediates*, 40(3), pp.1313–1325.

SHAMELI, K.; AHMAD, M.B.; ZAMANIAN, A.; SANGPOUR, P.; SHABANZADEH, P.; ABDOLLAHI, Y. and ZARGAR, M., 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles using Curcuma longa tuber powder. *International journal of nanomedicine*, 7, pp.5603–10.

Sharma, H.; Mishra, P.K.; Talegaonkar, S. and Vaidya, B., 2015. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discovery Today*, 20(9), pp.1143–1151.

SHARMA, H., MISHRA, P.K., TALEGAONKAR, S and VAIDYA, B., 2015. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. *Drug Discovery Today*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.009>

SHISHODIA, S., CHATURVEDI, M.M. and AGGARWAL, B.B., 2007. Role of curcumin in cancer therapy. *Current problems in cancer*, 31(4), pp.243–305.

SILVA, L.P.; REIS, I.G. and BONATTO, C.C. Green Synthesis of Metal Nanoparticles by Plants: Current Trends and Challenges. In: Basiuk, V.A.; Basiuk, E.V. (Org.). *Green Processes for Nanotechnology*. 1ed.: Springer International Publishing, 2015, v. 1, p. 259-275.

SIMÕES, M.C.F., SOUSA, J.J.S. and PAIS, A.A.C.C., 2015. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*, 357(1), pp.8–42.

SULAIMAN, G.M.; MOHAMMED, W.H.; MARZOOG, T.R.; AL-AMIERY, A.A.A.; KADHUM, A.A.H. and MOHAMAD, A.B., 2013. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), pp.58–63.

SULIMAN, Y.A.O.; SAUD ALARIFI, D.A.; HARRATH, A.H.; MANSOUR, L. and ALWASEL, S.H., 2013. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative stress, Proinflammatory and Genotoxic Effect of Silver Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells. *Environmental toxicology*, 0(0), pp.00–00.

SUMAN, T. Y.; RAJASREE, R.S.R.; KANCHANA, A. and BEENA, E.S., 2013. Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silver nanoparticles using Morinda citrifolia root extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, pp.74–78.

TAN, S.J.; YAN, Y.K.; LEE, P.P.F. and LIM, K.H., 2010. Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. *Future medicinal chemistry*, 2(10), pp.1591–1608.

THAKORE, S.I.; NAGAR, P.S.; JADEJA, R.N.; THOUNAOJAM, M.; DEVKAR, R.V. and RATHORE, P. S., 2015. Sapota fruit latex mediated synthesis of Ag, Cu mono and

bimetallic nanoparticles and their in vitro toxicity studies. *Arabian Journal of Chemistry*. A

THONGRAKARD, V., TITONE, R., FOLLO, C., MORANI, F., SUKSAMRARN, A., TENCOMNAO, T. and ISIDORO, C., 2014. Turmeric toxicity in A431 epidermoid cancer cells associates with autophagy degradation of anti-apoptotic and anti-autophagic p53 mutant. *Phytotherapy research*, 10.1002/ptr.5196.

TRAN, Q.H., NGUYEN, V.Q. and LE, A.-T., 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), p.033001.

VASANTH, K.; ILANGO, K.; MOHANKUMAR, R.; AGRAWAL, A. and DUBEY, G.P., 2014. Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, pp.354–359.

VELMURUGAN, P., ANBALAGAN, K., MANOSATHYADEVAN, M. LEE, K.J., LEE, S.M., OH S.G., BANG, K.S. and OH, B.T., 2014. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using Zingiber officinale root extract and antibacterial activity of silver nanoparticles against food pathogens. *Bioprocess Biosyst Eng*, 37:1935-1943.

VENKATESHAM, M.; AYODHYA, D.; MADHUSUDHAN, A.; VEERA BABU, N. and VEERABHADRAM, G., 2012. A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, 4(1), pp.113–119.

VYAS, A.; DAS, S.K.; SINGH, D.; SONKER, A.; GIDWANI, B.; JAIN, V. and SINGH, M., 2012. Recent Nanoparticulate Approaches of Drug Delivery for Skin Cancer. *Trends in Applied Sciences Research*, 7 (8), pp.620-635.

WANG, J.J.; ZENG, Z.W.; XIAO, R.Z.; ZHOU, G.L.; ZHAN, X.R. and WANG, S.L., 2011. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 6, pp.765–774.

YALLAPU, M.M., JAGGI, M. and CHAUHAN, S.C., 2012. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 17(1-2), pp.71–80.

YU, S.J.; YIN, Y.Q. and LIU, J.F., 2013. Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(1), pp.78–92.

ZAHIR, A.A. and RAHUMAN, A., 2012. Evaluation of different extracts and synthesised silver nanoparticles from leaves of Euphorbia prostrata against Haemaphysalis bispinosa and Hippobosca maculata. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), pp.511–520.

ZINK, B.S., 2014. Câncer de pele: a importância do seu diagnóstico, tratamento e prevenção. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 13(5), pp.76–83.