



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Síntese e funcionalização de superfície de nanopartículas de ouro para  
nanobraquiterapia.**

**MARIA EDUARDA ZAGANIN RIGO**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de Mestre  
Profissional em Tecnologia das Radiações  
em Ciências da Saúde na Área de  
Concentração  
Processos de Radiação na Saúde**

**Orientadora:  
Profa. Dra. Maria Elisa Chuery Martins  
Rostelato**

**São Paulo  
2024**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Síntese e funcionalização de superfície de nanopartículas de ouro para  
nanobraquiterapia.**

**Versão corrigida**

**MARIA EDUARDA ZAGANIN RIGO**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de Mestre  
Profissional em Tecnologia das Radiações  
em Ciências da Saúde na Área de  
Concentração  
Processos de Radiação na Saúde**

**Orientadora:  
Profa. Dra. Maria Elisa Chuery Martins  
Rostelato**

**São Paulo  
2024**

Fonte de Financiamento: Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro CNEN

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

RIGO , M. E. Z. ***Síntese e funcionalização de superfície de nanopartículas de ouro para nanobraquiterapia.*** 2024. 92 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.  
Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rigo , Maria Eduarda Zaganin  
Síntese e funcionalização de superfície de nanopartículas  
de ouro para nanobraquiterapia. / Maria Eduarda Zaganin Rigo ;  
orientadora Maria Elisa Chuery Martins Rostelato. -- São  
Paulo, 2024.  
92 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de  
Pós-Graduação em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde  
(Processos de Radiação na Saúde) -- Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2024.

1. Nanopartículas de ouro. 2. AuNPs-198. 3.  
Polietilenoglicol (PEG). I. Rostelato, Maria Elisa Chuery  
Martins , orient. II. Título.

Dedico a minha a família, em especial  
meus pais Ivair e Rose por terem sido  
meu suporte e incentivo para continuar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai, pois à Ele toda a honra e gloria.

Meu primeiro e mais importante agradecimento é para minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Elisa Chuery Martins Rostelato, que me aceitou de antemão como aluna do mestrado profissional e depois em seu grupo de pesquisa para realizar meu projeto.

Também gostaria de agradecer a outros professores e profissionais do CETER (Centro de Tecnologia das Radiações) que disponibilizaram tempo, recursos e conselhos para que este trabalho fosse realizado: Prof. Dr. Carlos Alberto Zeituni, Dr. Anselmo Feher e Dr. João Augusto Moura e o MSc. Wilmer Alexander Arcos Rosero em especial por ter ensinado a técnica de confecção de nanopartículas. Agradeço a Dra. Angelica Bueno Barbezan por ter me guiado no caminho de cultura celular e ensaios *in vivo* e por ter sido banca do meu seminário de área e ter o enriquecido.

Agradeço ao Prof.Dr.Daniel Perez por ter cedido equipamentos e conhecimentos sobre ensaios *in vitro* e técnicas, bem com seus alunos queridos Giovana Dias e Alex Rodrigues.

Também preciso agradecer a todos os meus colegas de laboratório no CETER, em especial aos envolvidos diretamente nos projetos em que trabalhei, por terem sido ótimas companhias: MSr. Priscila Santos Rodrigues; Thuany Correa Nogueira; Lara El Hajj Teodoro; Cristhian Talacimon; MSr.Hortência de Jesus Ferreira e a MSr. Ilca Marli Moitinho Amaral Medeiros. Estendo estes agradecimentos a todos os outros membros do grupo que sempre ofereceram apoio quando necessário.

Gostaria de agradecer também a outras pessoas que preciso citar aqui, mesmo que não tenham contribuído intelectualmente para o trabalho. Acredito que a qualidade de um trabalho de pós-graduação se beneficia diretamente das boas condições psíquicas de seu autor. Por isso, agradeço à minha família, em especial a meus pais Ivair Vanderlei Rigo e Rosemeire de Cássia Zaganin Rigo, que sempre foram muito presentes e solícitos, e deram suporte financeiro e emocional para que eu pudesse permanecer em São Paulo realizando este projeto; as minhas irmãs Maria Carolina e Maria Vitória, pela oportunidade de ter uma família única; a minha avó que sempre esteve cuidando de min Helena Ferronato Rigo; a um companheiro Felipe Chimin, que me incentivou na minha decisão de cursar o mestrado.

Agradeço também a todos os amigos, colegas de casa: Priscila e Gabriela e colegas de trabalho que tenho ou tive em São Paulo, a presença de todos em minha vida foi essencial para que eu me mantivesse focado em meus objetivos. Faço também um

agradecimento especial a todos os professores e profissionais envolvidos na minha formação ao longo dos anos, compreendendo que sem suas influências não estaria realizando este trabalho neste momento.

Por fim, agradeço à Coordenação do Mestrado Profissional pela oportunidade e a CNEM pelo apoio financeiro sem o qual este trabalho não poderia ser realizado. Me sinto agraciada pela chance de ter meu projeto financiado pelo poder público.

**“Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos,  
mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho”.**

C. S. Lewis

## RESUMO

RIGO, M. E. Z. **Síntese e funcionalização de superfície de nanopartículas de ouro para nanobraquiterapia**. 2024. 90 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

Nos últimos anos, o progresso rápido da nanotecnologia tem estimulado um interesse crescente na pesquisa de nanopartículas, em particular no combate ao câncer, uma das principais causas de morte mundial. Atualmente, as nanopartículas de ouro (AuNPs) são estudadas como uma alternativa aos tratamentos convencionais de câncer, que, apesar de sua eficácia, enfrentam desafios como efeitos colaterais devido à baixa seletividade. Este trabalho foca na síntese de AuNPs funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) tanto em sua forma não radioativa quanto radioativa, suas propriedades físico-químicas e potencial citotóxico em várias linhagens celulares, incluindo células tumorais hepáticas (HepG2 e HTC), células hepáticas normais (BRL3-A), células tumorais de cólon (HT29 MTX) e células endoteliais humanas (HUVEC). As AuNPs PEG foram produzidas pelo método adaptado de Turkevich, e suas características físico-químicas foram analisadas usando Dispersão Dinâmica de Luz com Zeta Sizer (DLS), espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão (MET), avaliando o efeito da quantidade de citrato de sódio, como agente redutor, no tamanho das nanopartículas. A citotoxicidade foi testada em diferentes concentrações de AuNPs PEG durante períodos de 6, 24 e 48 horas, utilizando o ensaio tetrazólio MTS com fenazina metil sulfato (PMS). Os resultados mostraram um diâmetro hidrodinâmico de 22,62 nanômetros, carga de superfície de -0,1269mV e tamanho médio de 12,12 nm através do MET. O perfil toxicológico das AuNPs PEG se destacou a partir de 24 horas, sem sensibilidade observada em 6 horas, e com efeitos notáveis em concentrações acima de 10%.

Palavras chave: Nanopartículas de ouro, Nanobraquiterapia. Polietilenoglicol (PEG),

## ABSTRACT

RIGO, M. E. Z. **Synthesis and surface functionalization of gold nanoparticles for nanobrachytherapy**. 2024. 90 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

In recent years, rapid progress in nanotechnology has stimulated growing interest in nanoparticle research, particularly in the fight against cancer, a leading cause of death worldwide. Currently, gold nanoparticles (AuNPs) are being studied as an alternative to conventional cancer treatments, which, despite their effectiveness, face challenges such as side effects due to low selectivity. This work focuses on the synthesis of AuNPs functionalized with polyethylene glycol (PEG) in both their non-radioactive and radioactive forms, their physicochemical properties, and cytotoxic potential in various cell lines, including hepatic tumor cells (HepG2 and HTC), normal hepatic cells (BRL3-A), colon tumor cells (HT29 MTX), and human endothelial cells (HUVEC). The AuNPs PEG were produced using the adapted Turkevich method, and their physicochemical characteristics were analyzed using Dynamic Light Scattering with Zeta Sizer (DLS), UV-Vis spectroscopy, and transmission electron microscopy (TEM), assessing the effect of the amount of sodium citrate, as a reducing agent, on the size of the nanoparticles. The cytotoxicity was tested at different concentrations of AuNPs PEG for periods of 6, 24, and 48 hours, using the MTS tetrazolium assay with phenazine methosulfate (PMS). The results showed a hydrodynamic diameter of 22.62 nanometers, a surface charge of  $-0.1269\text{mV}$ , and an average size of 12.12nm for TEM. The toxicological profile of the AuNPs PEG was notable from 24 hours, with no sensitivity observed at 6 hours, and with notable effects at nanoparticle concentrations above 10%.

Keywords: Gold nanoparticles, Nanobrachytherapy, Polyethylene glycol (PEG)

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	16
2.2 JUSTIFICATIVA.	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
3.1 ANATOMIA E RADIOSSENSIBILIDADE	18
3.2 CÂNCER E FORMAS DE TRATAMENTO	22
3.3 BRAQUITERAPIA	26
3.4 NANOPARTÍCULAS	27
3.4.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNPs)	28
3.5 POLIETILENO GLICOL (PEG)	30
3.6 BRAQUITERAPIA COM NANOPARTÍCULAS	32
3.7 EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS RADIOATIVAS EM TERAPIA ONCOLÓGICA.	33
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>36</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	36
4.1.1 MATERIAIS	36
4.1.2 DISSOLUÇÃO DO OURO	36
4.1.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	38
4.2 ATIVAÇÃO DO FIO DE OURO	39
4.2.1 AFERIÇÃO DA ATIVIDADE DAS AUNPs-198	39
4.2.2 ESPECTROMETRIA GAMA DO AU-198 POR DETECÇÃO NO GERMÂNIO HIPERPURO.	40
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	41
4.3.1 DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AGENTE DE NUCLEAÇÃO	41
4.3.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO E POTENCIAL ZETA	42
4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS)	43
4.3.3 ANÁLISES MICROSCÓPICAS (MET)	44
4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	46
4.4.1 MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.	46
4.4.2 CULTIVO CELULAR	47

4.4.3 AVALIAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO DAS AUNPs PEG	48
4.4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	49
4.4.4.1 Ensaio de viabilidade celular não radioativo	49
4.4.4.2 Ensaio de viabilidade celular radioativo	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>5.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO</b>	<b>54</b>
<b>5.2 AFERIÇÃO DA ATIVIDADE E ESPECTROMETRIA GAMA DO AU-198</b>	<b>54</b>
<b>5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS</b>	<b>57</b>
5.3.1 DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AGENTE DE NUCLEAÇÃO	57
5.3.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA	58
5.3.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-Vis)	61
5.3.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS (MET)	62
<b>5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.</b>	<b>64</b>
5.4.1 AVALIAÇÃO DA ESTERILIDADE DAS AUNPs-197	64
5.4.2 VIABILIDADE CELULAR COM AUNPs-197	65
5.4.3 VIABILIDADE CELULAR COM AUNPs-198	71
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico que abrange mais de 100 tipos de doenças malignas que são caracterizadas pelo crescimento desordenado de células localizadas com acelerado metabolismo, que subsequentemente podem invadir e comprometer tecidos adjacentes, órgãos distais ou mesmo a saúde geral do indivíduo afetado, levando-o à morte [1]. De acordo com os dados levantados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a International Agency for Research on Cancer (IARC) em 185 países, no ano de 2020 foram relatados 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes em decorrência da doença [2].

No Brasil, o número estimado de novos casos para o triênio de 2023 a 2025 aponta para uma ocorrência de 704 mil casos novos de câncer, sendo 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma [3]. Concentrando-se no câncer de cólon e reto que ocupam a quarta posição entre as localizações de câncer mais frequentes no Brasil, com 46 mil novos casos (6,5%); e o câncer de fígado ocupa a 15ª posição, com 10.700 novos casos para cada ano do triênio. Em termos de mortalidade, em 2020, ocorreram 20.245 óbitos por câncer de cólon e reto e 10.764 óbitos em decorrência do câncer de fígado [4].

O tratamento do câncer é determinado por um oncologista, que escolhe uma ou mais abordagens terapêuticas com base em diversos critérios, tais como a localização do câncer, o estágio da doença, a presença de metástases, a idade e o estado de saúde do paciente, o risco de efeitos colaterais associados a cada técnica, entre outros fatores. Até o momento, os tratamentos de câncer mais comuns são restritos a quimioterapia (tratamento com coquetéis químicos, tóxicos ao tecido tumoral), radioterapia e remoção cirúrgica do tumor. Apesar de muitos avanços nas opções de tratamento convencionais, a terapia do câncer ainda está longe de ser ideal porque apresenta algumas desvantagens. Os desafios mais frequentes estão na distribuição sistêmica não específica de agentes antitumorais, concentrações inadequadas de drogas que atingem o local do tumor, citotoxicidade intolerável, capacidade limitada de monitorar respostas terapêuticas e desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas [5,6].

A radioterapia pode ser classificada em duas modalidades com base em seu método de aplicação: a teleterapia, que envolve a exposição a uma fonte distante do paciente, onde um acelerador linear ou outras fontes geram fótons ou partículas que são

direcionados para campos de tratamento previamente calculados para administrar a dose necessária ao alvo; e a braquiterapia, na qual uma fonte selada é posicionada em contato direto ou muito próximo do tumor, permitindo que sua energia incida diretamente na área de interesse, com o objetivo de preservar os órgãos circundantes.

O tratamento do câncer de fígado é atualmente abordado de forma multidisciplinar, com as opções de tratamento sendo selecionadas de maneira personalizada, considerando a interação complexa entre o estágio do tumor, a extensão da doença hepática subjacente e a saúde geral do paciente. As recomendações para o manejo do câncer de fígado podem variar entre diferentes especialidades médicas e regiões geográficas, resultando em uma heterogeneidade no tratamento deste tipo de câncer [7]

O prognóstico para o câncer de fígado é desfavorável, com apenas 5% a 15% dos pacientes elegíveis para cirurgia, adequada apenas em estágios iniciais. Para estágios avançados, as opções de tratamento incluem: (a) Quimioembolização transarterial (TACE), que melhora a sobrevida de 2 anos em 23% em comparação com a terapia conservadora em pacientes com câncer hepatocelular (CHC) em estágio intermediário. (b) Uso oral do sorafenibe, um inibidor de quinase, é a opção principal para casos avançados, embora menos de um terço dos pacientes se beneficiem, e a resistência aos medicamentos ocorra seis meses após o início do tratamento. Além disso, tratamentos quimioterápicos a longo prazo, como o sorafenibe, têm problemas como toxicidade e ineficácia. Como resultado, as terapias atuais não são muito eficazes no combate a essa doença devastadora, destacando a necessidade de pesquisas para encontrar abordagens mais eficazes no tratamento do câncer de fígado [8,9].

A nanotecnologia tem o potencial de aprimorar tratamentos para neoplasias, melhorando a eficácia de medicamentos minimamente eficazes no combate a células cancerígenas. Ela pode revolucionar as abordagens terapêuticas combinadas, aprimorando a distribuição e retenção de medicamentos, o que, por sua vez, pode reduzir os efeitos colaterais [10,11]. As técnicas de nanopartículas oferecem um futuro promissor, permitindo a combinação de diferentes agentes terapêuticos para otimizar os resultados dos tratamentos [12,13].

A nanomedicina (aplicação médica da nanotecnologia) possui um potencial incrível para revolucionar a terapia e o diagnóstico do câncer, desenvolvendo engenhosos nanocompostos biocompatíveis para fins de entrega de drogas, que representam a aplicação mais pertinente das nanopartículas [14]. A premissa da braquiterapia com NPs é a possibilidade de se tratar o tumor de forma a minimizar dose de radiação nos tecidos

adjacentes sadios, uma vez que elas podem ser inseridas diretamente no tumor, evitando assim os efeitos indesejados do tratamento com radiação e diminuindo o desconforto do paciente. Para este tratamento, a injeção das NPs poderia ocorrer uma única vez diretamente no tumor, e o tamanho diminuto das partículas possibilitaria a difusão no tumor, criando assim uma distribuição homogênea das NPs e por consequência uma distribuição uniforme da radiação. É importante ressaltar que a literatura evidenciou que a braquiterapia com NPs é efetiva para inibir o crescimento tumoral [15,16,17].

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi desenvolver nanopartículas de ouro radioativas através do método de síntese química, especificamente revestidas com polietilenoglicol (PEG), para potenciais aplicações no tratamento do câncer, em específico o câncer de fígado. Isso inclui a síntese, o revestimento com PEG e a caracterização detalhada dessas nanopartículas, com um enfoque particular na avaliação de suas propriedades e eficácia em contextos oncológicos.

### 2.1 Objetivos específicos.

1. Desenvolvimento de Metodologia de Síntese de Nanopartículas de Ouro: Estabelecer um protocolo de síntese para nanopartículas de ouro, definindo proporções precisas de reagentes e condições ambientais ótimas. O objetivo é centrado no desenvolvimento de nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG (AuNPs PEG) reproduzíveis e aplicáveis para tratamento de linhagens celulares cancerígenas, com potencial para futuras aplicações *in vivo*.

2. Funcionalização das Nanopartículas com Polietilenoglicol (PEG): Determinar a quantidade ideal de PEG necessária para recobrir eficientemente as nanopartículas de ouro, evitando o uso excessivo de reagente, enquanto se mantém a funcionalidade desejada.

3. Caracterização Físico-Química das Nanopartículas: Após a produção e funcionalização, as nanopartículas foram submetidas a uma análise detalhada para caracterizar suas propriedades físico-químicas, incluindo tamanho, eficiência de ligação com o agente de recobrimento, estabilidade e toxicidade.

4. Testes de Citotoxicidade com Nanopartículas de Ouro PEG: Conduzir ensaios de citotoxicidade *in vitro* utilizando nanopartículas de ouro revestidas com PEG, tanto na forma não radioativa quanto radioativa, em três linhagens celulares hepáticas (HEPG2, HTC, BRL3-A), uma linhagem de cólon (HT 29) e uma linhagem de endotélio (HUVEC) utilizada como controle. Os testes foram realizados em diferentes concentrações e em três períodos temporais distintos (6, 24 e 48 horas).

5. Validação de Metodologia para Revestimento de Nanopartículas de Ouro com PEG: Desenvolver e validar um método eficiente e reproduzível para o revestimento de nanopartículas de ouro com PEG, adequado para uso no “Laboratório de Produção de Fontes Radioativas para Braquiterapia”.

## **2.2 Justificativa.**

O uso de nanomateriais e a nanotecnologia têm sido cada vez mais difundidos e estão avançando para a fase de aplicação clínica [18]. AuNPs têm propriedades físicas e químicas únicas, manifestadas principalmente nos seguintes aspectos: são relativamente seguras, estáveis e fáceis de preparar, e possuem muitas características únicas, como efeitos de tamanho pequeno, de superfície, de tamanho quântico, elétricos e ópticos [19,20,21]. A pesquisa nas AuNPs radioativas é particularmente importante, dado que elas apresentam particularidades únicas, oferecendo vantagens como melhor capacidade de penetração e menor risco em comparação com os medicamentos tradicionais, tanto em tratamento quanto em diagnóstico [22,23]. Essas características singulares tornam as AuNPs ferramentas valiosas na biomedicina, abrindo novas possibilidades para avanços significativos no tratamento do câncer.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

Neste capítulo, foi realizado uma revisão bibliográfica dos temas pertinentes ao atual trabalho a fim de embasá-lo. Com o intuito de explorar os temas centrais e destacar os conceitos fundamentais para o progresso deste projeto, abordamos alguns deles com ênfase histórica. Isso visa situar a execução deste trabalho no contexto do desenvolvimento das técnicas de nanopartículas, fornecendo uma perspectiva temporal sobre o estágio atual dessas técnicas.

As seções foram divididas de forma a trazer, em ordem lógica, uma compreensão facilitada dos conceitos envolvidos. Na seção 3.1, descreve-se a anatomia do fígado e algumas considerações sobre sua radiosensibilidade; estes conceitos são importantes para compreender a seção 3.2, que trata dos tumores hepáticos, suas características e formas de tratamento; isto leva diretamente à seção 3.3, que trata sobre a braquiterapia em específico sua eficácia. A seção 3.4 introduz alguns conceitos básicos nanopartículas e nanopartículas de ouro e sua crescente aplicação nos últimos anos, bem como a possível modificação de sua superfície; importante para a discussão da seção 3.5, traz um pequeno histórico do uso do polietilenoglicol e suas propriedades quando agregado à de nanopartículas. A seção 3.6 que sintetiza dois termos chaves do trabalho, o uso de nanopartículas em braquiterapia, dando origem ao termo nanobraquiterapia, e por fim a seção 3.7 revisa artigos que utilizam nanopartículas radioativas com finalidade terapêutica oncológicas e caracterizaram fontes para braquiterapia, incluindo nanopartículas de ouro radioativas que apresenta o radioisótopo utilizado neste trabalho, o Au-198, e sua importância na braquiterapia.

#### **3.1 Anatomia e radiosensibilidade**

O maior órgão maciço do corpo humano é o fígado, que exerce uma variedade de funções essenciais para a saúde do organismo. A compreensão da fisiologia hepática é essencial para a análise dos processos patológicos que afetam o órgão [24]. O fígado, a maior glândula do corpo, tem uma massa de aproximadamente 1.500 gramas em adultos, representando 2,5% do peso corporal total [25]. Está localizado no espaço inferior direito e em uma parte do diafragma esquerdo e é cercado por uma membrana fibrosa chamada cápsula de Glisson. O peritônio visceral cobre anteriormente e

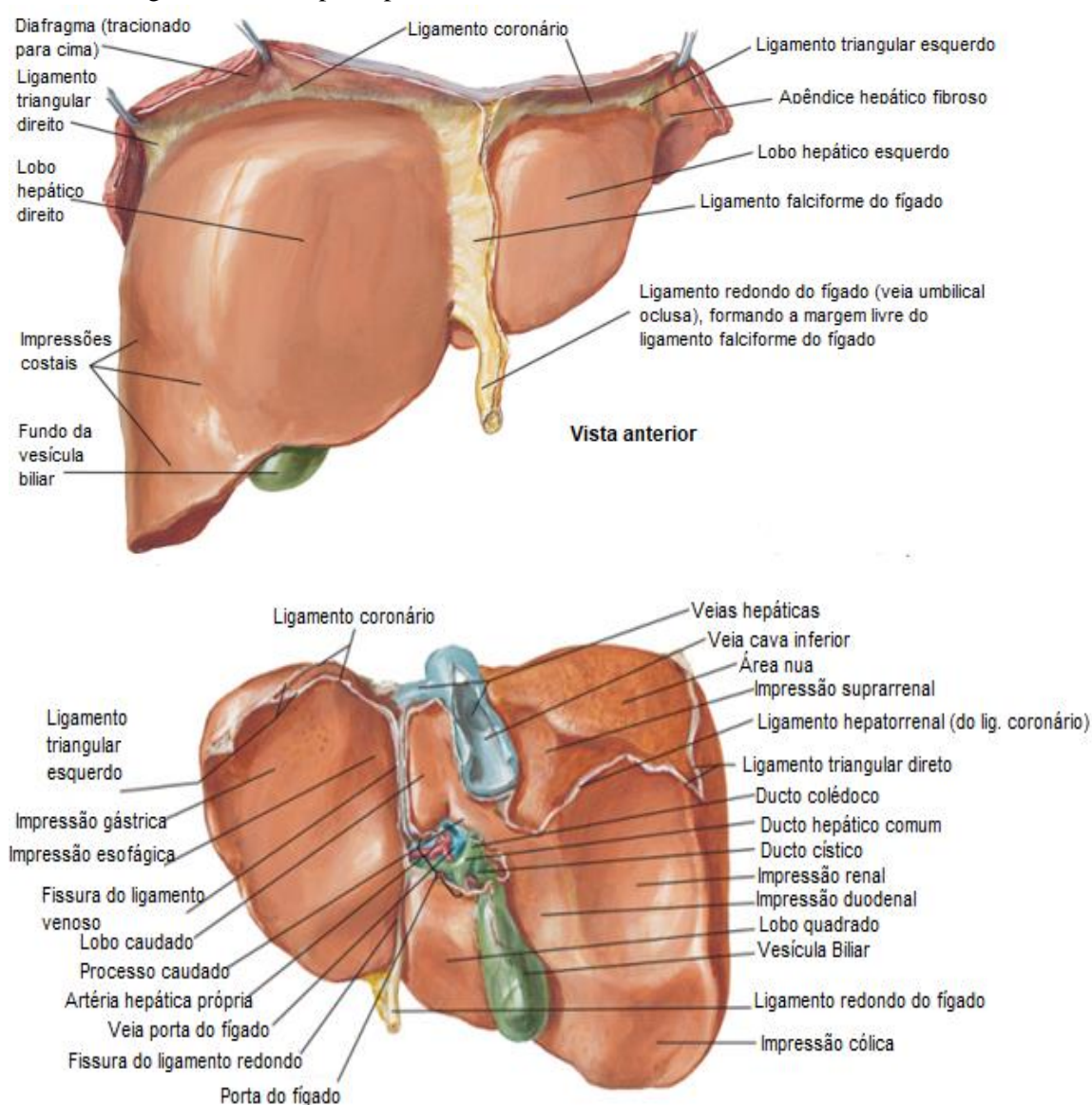
posteriormente o fígado, exceto em uma área exposta onde confina diretamente com o diafragma. É suspenso na parte superior do diafragma pelo ligamento coronário, que se estende para fora para formar os ligamentos triangulares direito e esquerdo. Depois disso, ele é suspenso anteriormente pelo ligamento falciforme, e na porta hepática pelos ligamentos gastro-hepático e hepatoduodenal. O ligamento hepatoduodenal envolve a porta hepática, incluindo a artéria hepática, a veia porta e os ductos biliares extra-hepáticos [26] como mostrado na Figura 1.

A quantidade de sangue presente no fígado é equivalente a aproximadamente 25% do débito cardíaco em qualquer momento [27]. Os dois principais sistemas vasculares que fornecem sangue ao fígado são a veia porta e a artéria hepática. Segundo Burt e Day (2002), a artéria hepática fornece 30% do fluxo sanguíneo e 60% do oxigênio, enquanto a veia porta fornece cerca de 70% e 40% do oxigênio. O sangue portal chega ao fígado através das veias mesentérica, gástrica, esplênica e pancreática. Lá, ele se ramifica nos lados direito e esquerdo do fígado. A racionalização portal é o processo pelo qual os lobos do fígado recebem diferentes nutrientes, toxinas e outros componentes. Isso pode ocorrer devido a uma mistura incompleta de sangue proveniente do baço e do trato gastrointestinal [28,29,30,31,32]. Por exemplo, o sangue que drena o estômago e o baço tende a fluir para o lado esquerdo do fígado [33].

O fígado normal pode conter pelo menos quinze tipos de células diferentes [34,35,36,27,37], destacam-se cinco tipos de células especializadas, classificáveis em tipos parenquimatosos e não parenquimatosos (ver Tabela 1). Os hepatócitos são os mais abundantes e constituem 80% do volume do fígado e 60% das células totais, eles são responsáveis pela maior parte das funções do fígado, incluindo síntese e armazenamento de glicogênio e filtração do sangue venoso portal [38]. O fígado é um dos poucos órgãos do corpo capaz de regeneração. Consequentemente, os hepatócitos são considerados células-tronco onipotentes (ou células pós-mitóticas reversíveis). Embora não se dividam regularmente em condições normais, podem ser recrutados para o ciclo celular e dividir-se para produzir dois hepatócitos, regenerando assim o órgão a partir de apenas 25% do tecido restante, porém o processo de regeneração apenas ocorre se o tecido não estiver comprometido, seja por fibrose ou cirrose. Um grande número (3–20%) das células biologicamente importantes restantes são células endoteliais sinusoidais (SECs), elas são a barreira primária entre o sangue e os hepatócitos e atuam para filtrar fluidos, solutos e partículas entre o sangue e o espaço de Disse [39,40] e representam até 20% das células do fígado. Células de Kupffer representam 15% das células do fígado (30% das células sinusoidais) e o derivadas de monócitos circulantes [41,42,43], são macrófagos hepáticos

especializados com funções imunológicas e fagocíticas [44]. Células estreladas hepáticas (HSC) antes eram conhecidas como Ito ou células armazenadoras de gordura, e representam aproximadamente 5% das células do fígado, eles desempenham um papel importante na fibrogênese hepática, cirrose e regeneração [45,46,47,48,49]. Normalmente, as HSC produzem matriz extracelular, regulam o tônus microvascular, armazenam e metabolizam vitamina A e lipídios e se transformam em miofibroblastos quando ativadas. Eles geralmente expressam filamentos de desmina e actina do músculo liso na forma de miofibroblastos ativados. E epitélio biliar ou as células epiteliais do ducto biliar transportam a bile e mantêm seu pH [50].

Figura 1 - Face do fígado com suas principais estruturas marcadas.



Fonte: Adaptado pela autora de Juza RM et al.,2014 [51].

Tabela 1 - Tipos de células hepáticas e suas funções específicas.

	<b>Função</b>
<b>Hepatócitos Parenquimatoso</b>	Principais tipos de células do fígado. Síntese, armazenamento, degradação de substâncias portais, metabolismo, função endócrina e exócrina
<b>Células endoteliais sinusoidais não parenquimatosas</b>	O plexo fenestrado permite a comunicação do sangue portal com os hepatócitos
<b>Células de Kupffer</b>	Fagócitos do fígado, liberam citocinas
<b>Células estreladas hepáticas</b>	Função na regeneração após lesão, precursora do miofibroblasto, armazenamento de vitamina A
<b>Células epiteliais do ducto biliar</b>	Transporta a bile, secreta bicarbonato e água

Fonte: Adaptado pela autora Malarkey et al., 2005 [33]

A Comissão Internacional de Proteção Radiológica (International Commission on Radiological Protection – ICRP), em sua publicação 118 [52], que trata dos efeitos da exposição à radiação nos tecidos e órgãos humanos, reserva uma seção para comentar sobre o sistema digestivo. A seção divide os dados clínicos sobre doses terapêuticas em três partes do sistema digestivo, sendo mucosa e esôfago, trato gastrointestinal e por fim glândulas salivares, fígado e pâncreas. Em cada partes destacasse as condições adversas de pacientes submetidos à irradiação, que no caso do fígado é degradação dos hepatócitos, destacados anteriormente com o tipo celular mais abundante no fígado.

Devido ao fato de que a renovação dos hepatócitos geralmente ser lenta, a lesão aguda por radiação no fígado não representa a morte celular clonogênica. Em vez disso, a doença hepática induzida pela radiação geralmente ocorre de forma subaguda, geralmente aproximadamente 3 meses após o início da radioterapia, e é conhecida como "doença veno-oclusiva". A área de congestão centro lobular e a necrose são as marcas patológicas da doença veno-oclusiva. Estas lesões podem causar insuficiência hepática franca em situações extremamente graves. Quando a maior parte ou todo o órgão é exposto à radiação, o fígado tem um efeito de volume significativo e o limiar para lesão é baixo. Para exposição de todo o fígado com radioterapia fracionada convencionalmente, doses totais de 28–30 Gy estão associadas a uma incidência de 5% de doença hepática [53,54]. Se apenas um terço do fígado for exposto, a dose para uma incidência de dano de 5% aumenta para >42 Gy, e se <25% do volume efetivo do fígado for irradiado, doses muito mais altas de radiação são bem toleradas [55]. No entanto, foi demonstrado que a disfunção hepática pré-existente aumenta a susceptibilidade a danos hepáticos induzidos

pela radiação. O fígado em regeneração, como após a ressecção, também é significativamente menos tolerante [56], e estudos experimentais mostraram que a lesão latente por radiação do fígado pode ser desmascarada por uma ressecção subsequente.

### **3.2 Câncer e formas de tratamento**

Uma célula considerada cancerosa por consequência de mutações genéticas que alteram seu comportamento, aumentando o metabolismo e perda de sua capacidade apoptótica. Sendo assim, esta célula passa a se multiplicar mais rapidamente e deixa de morrer espontaneamente, formando um tecido que cresce desordenadamente. Devido ao rápido metabolismo das células, o corpo, que não as reconhece como células diferenciadas, passa a vascularizar mais a região, e eventualmente algumas das células podem adentrar o sistema circulatório e passar a se propagar em outras partes do corpo, o que se chama de metástase [4].

Quando o crescimento passa a ser desordenado e autônomo, é chamado de neoplasia, ou tumor. Um tumor pode ser ainda classificado em benigno ou maligno; benigno quando cresce de forma lenta e organizada, apresentando limites nítidos e sem invadir tecidos vizinhos; maligno quando pode provocar metástases e se tornar mais resistente ao tratamento, podendo levar à morte, principalmente se não tratado. É importante ressaltar que o tumor benigno, apesar do nome, também pode gerar complicações clínicas: suas células ainda são diferenciadas como no tecido de origem, porém não invadem outros tecidos, mas seu crescimento desordenado pode fazer com que os tecidos vizinhos sejam comprimidos, afetando o órgão em que estão presentes [4].

As doenças malignas são a segunda causa mais comum de morte entre crianças e adultos, mesmo depois de setenta anos desde o primeiro uso relatado de quimioterapia. Embora a classificação de câncer seja relativamente simples, a compreensão da base da heterogeneidade do câncer é complexa. Cada câncer é reconhecido por ocorrer em uma idade específica, com mais frequência em um sexo do que em outro, e tem uma morfologia específica – geralmente semelhante ao tecido de origem. Os avanços na imagem e na histologia permitiram-nos segregar ainda mais os diagnósticos de cancro em estágios e graus distintos que predizem diferentes respostas ao tratamento e prognósticos [57].

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Câncer) estimativas GLOBOCAN para 2020 [58] para 185 países e 36 tipos de câncer. O perfil do câncer, a nível global e por região do mundo, é construído utilizando as melhores fontes disponíveis de dados de incidência e mortalidade por câncer num determinado país. Portanto, a validade das estimativas nacionais depende do grau de representatividade e da qualidade da informação de origem. As estimativas fornecidas não refletem o impacto do coronavírus, da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), o vírus responsável pela pandemia Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [59], pois são baseadas em extrapolações de dados sobre o câncer coletados em anos anteriores à pandemia. Houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma, exceto carcinoma basocelular) e 10 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma, exceto carcinoma basocelular) em todo o mundo em 2020. Para o ano 2030, a IARC estimou que devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial haverá cerca de 73 milhões de pessoas vivas com a doença, serão descobertos aproximadamente 21,7 milhões de novos casos, e ocorrerão 13,2 milhões de mortes devido ao câncer (considerando-se o câncer de pele não melanoma). [60]

Para o Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. As taxas de incidência dependem da capacidade de diagnóstico dos casos de câncer, que, por sua vez, está relacionada à adequação, ao acesso e à utilização dos serviços de diagnóstico, especialmente para pele não melanoma, leucemias e cânceres de cérebro, fígado e pâncreas. O número estimado de casos novos de câncer de fígado para o Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 10.700 casos, correspondendo ao risco estimado de 4,95 casos por 100 mil habitantes, sendo 6.390 em homens e 4.310 em mulheres [4].

O câncer primário de fígado inclui carcinoma hepatocelular (CHC) (compreendendo 75%-85% dos casos) e colangiocarcinoma intra-hepático (CCA) (10%-15%), bem como outros tipos raros, sendo o sexto câncer mais comumente diagnosticado e a terceira principal causa de morte por câncer em todo o mundo em 2020, com aproximadamente 906.000 novos casos e 830.000 mortes [61]. Apesar dos avanços no seu tratamento, o câncer do fígado continua a ser um dos mais difíceis de tratar. Para pacientes com CHC precoce, cirurgia, terapias destrutivas locais e transplante de fígado proporcionam potencial curativo. No entanto, a recorrência do CHC continua a ser um grande problema após o tratamento curativo, atingindo uma incidência de mais de 70%

em 5 anos [62]. Mesmo em pacientes com CHC precoce e pequeno (<3 cm) submetidos a cirurgia, a taxa de sobrevivência em 5 anos não é satisfatória (47% a 53%) [63,64,65]. Já a taxa de sobrevivência global em 5 anos dos pacientes com câncer do fígado avançado é inferior a 5%, nesses casos, que são os mais comuns, os pacientes não são elegíveis para terapias curativas. Os fatores de risco para CHC são altamente heterogêneos entre pacientes e regiões, incluindo hepatite B crônica (HBV), vírus da hepatite C (HCV), cirrose alcoólica, obesidade/diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)/fígado gorduroso não alcoólico (NASH). A hepatite crônica causada pelas causas acima induz ainda mais a fibrose hepática e evolui para cirrose após 10 anos, que é o principal processo de formação de CHC [66]

A necessidade de se classificar os casos de câncer em estádios baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevida são diferentes quando a doença está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros órgãos. Estadiar um caso de câncer significa avaliar seu grau de disseminação. Para tal, há regras internacionalmente estabelecidas, as quais estão em constante aperfeiçoamento. Existem vários sistemas de estadiamento para o prognóstico do CHC, incluindo os sistemas comumente usados de metástase de nódulos tumorais (TNM), Okuda e Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), bem como o Programa Italiano de Câncer de Fígado (CLIP) [67,68,69,70,71,72,73,74]. O sistema de estadiamento TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC) para CHC, revisado em 2010, identifica os fatores prognósticos mais importantes: o número de tumores e a presença e extensão da invasão vascular dentro do tumor [74], porém é apenas aplicável prospectivamente em pacientes submetidos a ressecção cirúrgica ou transplante de fígado para CHC [75,76]. O sistema de pontuação prognóstica proposto por Okuda e colegas inclui o tamanho do tumor e a gravidade da cirrose [67], os pacientes estadiados de acordo com esse sistema apresentavam em sua maioria CHC irresssecável. A pontuação CLIP, combina um índice da gravidade da cirrose hepática (estágio de Child-Pugh), morfologia e extensão do tumor, níveis séricos de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) e trombose da veia porta para determinar o prognóstico de pacientes com câncer de fígado, mostrando ser útil na estratificação de pacientes com CHC avançado [77,78,79,80]. O sistema de estadiamento BCLC identifica estágios clínicos com base na extensão do tumor primário, invasão vascular e disseminação extra-hepática pelo tumor, status de desempenho de cada pessoa e função hepática basal (estágio Child-Pugh), demonstrando melhor estratificação prognóstica para pacientes com cirrose e CHC [81], pacientes com CHC submetidos à ablação por radiofrequência (RFA) [82], pacientes com CHC tratados principalmente com terapias radicais [83], houve controvérsias em torno do sistema BCLC,

particularmente em sua aplicação no tratamento cirúrgico de pacientes com CHC [84,85,86].

Atualmente, o tratamento do câncer de fígado é multidisciplinar, e as recomendações para o tratamento multimodal do câncer de fígado variam, sendo geralmente escolhidas individualmente de acordo com a complexa interação entre o estágio do tumor e a extensão da doença hepática subjacente, além da condição geral de saúde do paciente. Para pacientes com carcinoma hepatocelular em estágio inicial, uma hepatectomia parcial pode ser curativa; entretanto, a função hepática geral do paciente, a avaliação do tumor e a anatomia hepática devem ser levadas em consideração, a ressecção é recomendada em pacientes com função hepática preservada e ter uma localização tumoral cirurgicamente [87,88]. O transplante de fígado também oferece aos pacientes uma potencial opção de tratamento curativo no carcinoma hepatocelular inicial, sendo considerado o tratamento de escolha para pacientes com CHC em estágio inicial com cirrose moderada a grave [89,90]. A terapia ablativa locorregional, incluindo injeção de etanol, ablação por radiofrequência e crioterapia, pode ser o tratamento primário para pacientes inoperáveis selecionados com CHC. Para pacientes com carcinoma hepatocelular em estágio intermediário, a terapia de embolização transarterial (TAE) (partículas embólicas sem quimioterapia) ou TACE (drogas quimioterápicas e partículas embólicas) aproveita o suprimento de sangue arterial característico do CHC e induz necrose tumoral por canulação seletiva das artérias hepáticas que alimentam o tumor e infusão de vaso-oclusivo partículas e/ou quimioterapia [91,92]. Para pacientes em estágio avançado da doença, a terapia padrão de linha de frente Sorafenibe é a primeira terapia direcionada aprovada para o tratamento de CHC avançado em pacientes com função hepática relativamente preservada [93]. Também pode ser indicado imunoterapia e terapia contra vírus oncolíticos. Já quimioterapia não tem sido usada rotineiramente para pacientes com CHC avançado porque, tradicionalmente, o CHC é considerado um tumor refratário à quimioterapia [94].

Apesar das novas abordagens de tratamento surgirem como resultado dos avanços na compreensão das fases que resultam na hepatocarcinogênese cientistas e médicos estão à procura de novas formas de tratamento para melhorar a sobrevida dos pacientes com câncer de fígado com prognósticos ruins. Novos horizontes para melhores resultados para doenças malignas são abertos pela combinação de medicamentos e mudanças nos métodos de administração e entrega de medicamentos. Aprimoramentos futuros em biomarcadores preditivos, diagnósticos e prognósticos de CHC e terapia

direcionada molecularmente podem aumentar a sobrevida global de pacientes com CHC em todos os estágios [96].

### 3.3 Braquiterapia

A braquiterapia é uma técnica de radioterapia que direciona radiação concentrada para o tratamento de tumores, sendo descrita como "radioterapia interna". Esta abordagem permite uma administração mais precisa da radiação, minimizando o impacto sobre os tecidos saudáveis adjacentes. É eficaz para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo próstata, colo do útero, mama, pulmão e pele, entre outros. A técnica é notável por permitir tratamentos mais curtos em comparação com outras técnicas de radioterapia, o que pode impedir a divisão e o crescimento de células cancerígenas sobreviventes entre os tratamentos. Além disso, muitos pacientes toleram bem a braquiterapia e ela está associada a um baixo risco de efeitos colaterais graves.

Especificamente no tratamento do câncer de colo uterino, a Braquiterapia de Alta Taxa de Dose (HDR) tem sido cada vez mais utilizada, conforme demonstrado por Martelletti e colaboradores (2020), que destacam as repercussões positivas desta técnica na qualidade de vida e funcionalidade das pacientes.

Nos últimos anos, uma nova abordagem terapêutica de radioembolização mostrou-se promissora para o tratamento de pacientes com CHC irrissecável. A radioembolização, infunde microesferas radioativas (Ítrio-90 [Y-90]) nas artérias hepáticas que alimentam o tumor. Estas microesferas infundidas implantam-se seletivamente nas arteríolas tumorais e, assim, fornecem radiação *in locu* [97].

Os avanços tecnológicos em braquiterapia têm melhorado as taxas de sobrevida e sobrevida livre de progressão. Estudos como o de Trifanescu e colaboradores (2021) evidenciam os resultados oncológicos a longo prazo em pacientes com câncer cervical submetidos a tratamentos trimodais, incluindo a radioterapia, destacando a eficácia da braquiterapia em combinação com outras formas de tratamento [98].

Além disso, as recomendações de tratamento para a braquiterapia em contextos de países de baixa e média renda foram exploradas no estudo da American Brachytherapy Society por Suneja e colaboradores (2016). Este estudo oferece orientações valiosas sobre como a braquiterapia pode ser adaptada e aplicada efetivamente em diferentes contextos socioeconômicos [99].

A braquiterapia, portanto, representa uma opção de tratamento crucial e eficaz para diversos tipos de câncer, e continua a evoluir com o desenvolvimento tecnológico e a pesquisa contínua.

### **3.4 Nanopartículas**

A National Nanotechnology Initiative (NNI) nos Estados Unidos define nanotecnologia como "uma ciência, engenharia e tecnologia conduzida em nanoescala (1 a 100 nm), onde fenômenos únicos permitem novas aplicações em uma ampla gama de campos, desde química, física e biologia, medicina, engenharia e eletrônica" [100]. Uma nanopartícula pode ser definida de várias maneiras, sendo um material com menos de 100 nanômetros em pelo menos uma de suas dimensões quando considerado apenas seu tamanho ou um nanomaterial deve possuir ao menos 50 % de partículas em que ao menos uma dimensão é menor ou igual a 100 nm, considerando a distribuição de tamanho das partículas [101,102,103].

Os nanomateriais têm um enorme valor potencial de aplicação na pesquisa biomédica devido às propriedades físicas e químicas especiais da estrutura dos nanomateriais, incluindo terapia de luz, imagem fotoacústica, diagnóstico precoce de câncer, transporte de medicamentos e tecidos, engenharia, etc. Atualmente, os nanomateriais têm sido aplicados em componentes eletrônicos, tintas, equipamentos esportivos, cosméticos, aditivos alimentares e muitos outros produtos comerciais [104,105,106].

Avanços recentes na nanotecnologia levaram ao desenvolvimento de várias formulações de nanopartículas para aplicações diagnósticas e terapêuticas. As nanopartículas de diagnóstico têm como objetivo facilitar a visualização de patologias e melhorar a compreensão de princípios (pato) fisiológicos importantes de várias doenças e tratamentos de doenças. Clinicamente, no entanto, os nanodiagnósticos se mostram úteis em um número limitado de situações, devido às complexas exigências das suas propriedades farmacocinéticas e eliminação. Portanto, a maioria das formulações de nanopartículas utilizadas atualmente nas clínicas é aplicada para fins terapêuticos. As nanopartículas terapêuticas visam melhorar a acumulação e libertação de agentes farmacologicamente ativos no sítio patológico, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a incidência e intensidade dos efeitos secundários, reduzindo a sua localização em tecidos saudáveis [107,108].

As características intrínsecas das nanopartículas são uma grande promessa para a integração de agentes diagnósticos e terapêuticos em uma única formulação de nanopartículas, permitindo sua aplicação para fins teranósticos, como monitoramento da biodistribuição e acumulação no local alvo, visualização e quantificação da liberação do medicamento e avaliação longitudinal da terapêutica. eficácia. Essas nanopartículas teranósticas podem ser usadas para personalizar terapias baseadas em nanomedicina, permitindo a pré-seleção do paciente e controlando a eficácia terapêutica [109,110,111].

As possibilidades de áreas de aplicação para os nanomateriais são amplas e portanto, existem vários tipos de NPs. Inúmeras formulações de nanopartículas foram projetadas e avaliadas nos últimos anos, incluindo, por exemplo, lipossomas, polímeros, micelas, proteínas, anticorpos, nanopartículas de ouro, nanopartículas ultrapequenas de óxido de ferro superparamagnético (USPIO) e nanotubos, que possuem propriedades intrínsecas que influenciam sua biodistribuição, eliminação e acúmulo no local alvo. A maioria dessas nanopartículas é utilizada para fins terapêuticos [112,113,114]. A literatura aponta algumas NPs que vêm sendo estudadas para o uso em braquiterapia tais como 198-Au, 103-Pd e 177-Lu [115,116,117,118,119,120]

Propriedades de superfície como hidrofiliabilidade, carga superficial e modificação de superfície podem determinar o comportamento das nanopartículas *in vivo*, *in vitro* e no meio ambiente [121,122]. As propriedades superficiais das nanopartículas também desempenham um papel importante na interação entre nanopartículas e membranas celulares.

#### 3.4.1 Nanopartículas de ouro (AuNPs)

O ouro (Au) é um dos elementos químicos menos reativos. Desde o início, o grande valor do ouro foi apreciado devido à sua ocorrência rara, manuseio e fabricação fáceis, resistência à corrosão e outras reações químicas e, claro, sua cor única. O ouro se tornou rapidamente o símbolo de poder e riqueza e tem sido usado para cunhagem e produção de joias. O “padrão ouro” foi por muito tempo aplicado como política monetária, sendo abandonado por volta de 1976, logo após a retirada das moedas de ouro de circulação na década de 1930 [123].

A aplicação medicinal de ouro e seus complexos também tem uma longa história. Os primeiros dados sobre ouro coloidal (suspensão coloidal de nanopartículas de ouro em um fluido) podem ser encontrados em antigos papéis chineses, árabes e indianos

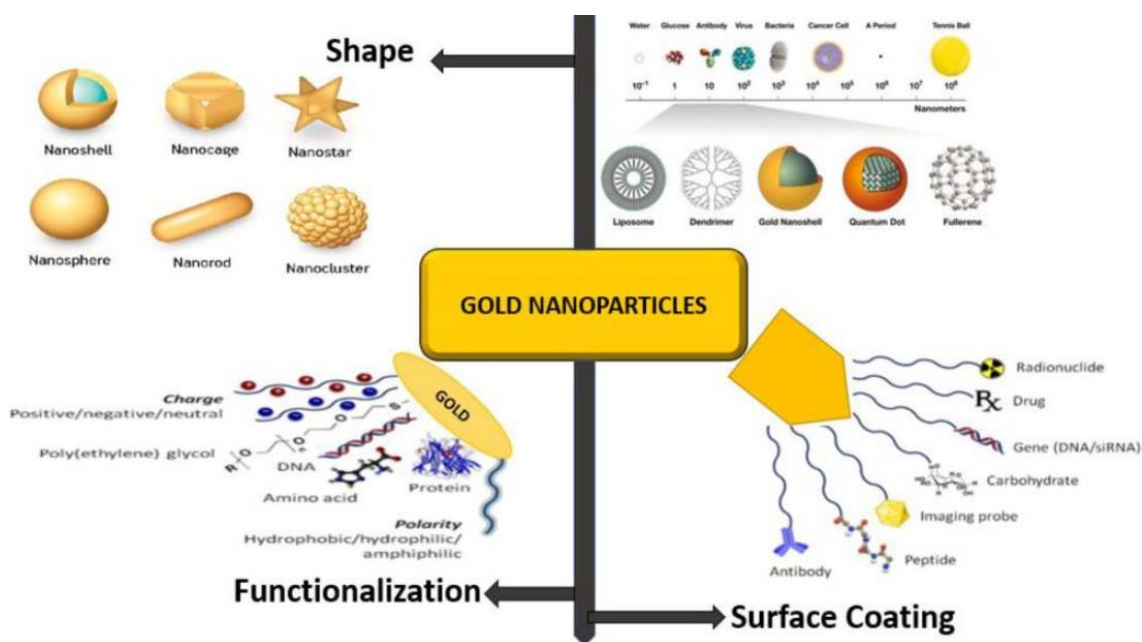
dos séculos V a IV aC, que o recomendavam para o tratamento de várias doenças, embora o mecanismo de ação foi mal compreendido. Na Europa medieval, o ouro coloidal era frequentemente estudado em laboratórios alquimistas e usado para o tratamento de doenças mentais, sífilis, diarreia e até recomendado como elixir da longevidade [123].

Michael Faraday foi quem apresentou o primeiro artigo científico sobre nanopartículas de ouro em 1857, que atribuiu a cor vermelha à natureza coloidal dos AuNPs e descreveu suas características de espalhamento de luz [124]. Depois de cinquenta anos, as propriedades de absorção visível dos AuNPs foram explicadas usando as equações eletromagnéticas de Maxwell [124]. Em 1971, os pesquisadores britânicos Faulk e Taylor elaboraram um método revolucionário de conjugação anticorpo-ouro coloidal para a visualização direta por microscopia eletrônica de antígenos de superfície de *Salmonellae* [125]. Esta descoberta deu início a vários estudos ao longo dos próximos 40 anos, dedicados a aplicações biomédicas de nanopartículas de ouro, reconhecendo especificamente várias biomacromoléculas devido à funcionalização da superfície e às propriedades características.

Nos últimos anos, o uso de nanopartículas de metal nobre ampliou. O foco dos cientistas está voltado para as nanopartículas de ouro (AuNPs), que têm propriedades versáteis e possíveis aplicações em química clínica, bioimagem e terapia do câncer, bem como a distribuição de uma droga direcionada sendo constantemente caracterizada. AuNPs são amplamente utilizados como entrega de drogas após modificar suas superfícies pela ligação de ligantes de biomoléculas. Pesquisas de modelagem têm mostrado cada vez mais interesse nos AuNPs e a investigação de sua toxicidade, tamanho, forma e modificação de superfícies tem sido proposta [126].

As AuNPs ainda podem ser confeccionadas em diferentes geometrias (esférico, cúbico e cilíndrico, por exemplo), e já são utilizadas, por exemplo, para carregar nucleotídeos, anticorpos e proteínas, além de outras aplicações biotecnológicas podendo ser exemplificado na figura 2 [127].

Figura 2: Morfologia (esférica), tamanho, revestimento superficial (carboidrato, DNA/RNA, peptídeo, carregamento com drogas e usado para sondagem de imagem) e funcionalização (por anticorpo, DNA, proteína) de AuNPs.



Autor: Reproduzido de Yaqoob SB, et al., 2020 [127]

Os métodos para a obtenção de AuNPs por redução química possuem duas etapas principais, a redução e a estabilização. Os agentes de redução fornecem elétrons ao  $\text{Au}^{3+}$ , proveniente do ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), possibilitando a sua redução para  $\text{Au}^{1+}$  e então para  $\text{Au}^0$ , que é o estado de ionização estável que permite a obtenção das nanopartículas. Os agentes de estabilização por sua vez evitam a agregação das nanopartículas, atribuindo a elas uma força de repulsão que pode controlar características como taxa de crescimento, tamanho, geometria [128,129].

### 3.5 Polietileno glicol (PEG)

A nomenclatura dos polietilenoglicóis específicos geralmente se baseia no número de unidades de óxido de etileno ou seu peso molecular aproximado, como PEG-4 ou PEG-200. Os polietilenoglicóis com menos de 600 pesos moleculares são líquidos, enquanto os com mais de 1000 pesos moleculares são sólidos. Essas substâncias não são voláteis, altamente solúveis em água, não são insípidas e não são inodoros. O polietilenoglicol (PEG) é um polímero simples, hidrofílico e flexível que está fisicamente ligado a peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipossomas e nanopartículas. Essa ligação é amplamente utilizada para melhorar sua estabilidade, solubilidade e propriedades farmacocinéticas, de forma a reduzir a depuração renal, bloquear locais de ligação de

anticorpos e proteínas e aumentar a meia-vida e a eficácia da terapia com moléculas [130,131]. O aumento da meia-vida na circulação é particularmente vantajoso para medicamentos injetáveis porque a frequência de administração pode ser reduzida, levando a uma melhor adesão do paciente e qualidade de vida.

Métodos para prolongar o tempo de circulação são necessários, pois as proteínas e peptídeos são rapidamente degradados e eliminados da corrente sanguínea. Uma maneira de fazer isso é utilizar um polímero inerte para cobrir a superfície do medicamento. Esse polímero é capaz de resistir às interações com os elementos da corrente sanguínea, fornecendo ao medicamento características que são chamadas de "furtivas". O polietilenoglicol (PEG) é o polímero "furtivo" mais amplamente utilizado no campo de distribuição de medicamentos, devido ao seu longo histórico de segurança em humanos e à classificação como Geralmente Considerado como Seguro (GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA). Considerados os primeiros relatos de PEGilação para administração de medicamentos, Davis e Abuchowski descreveram em 1977 a ligação covalente do PEG à albumina sérica bovina e às proteínas catalase do fígado [132].

Em 1990, o FDA aprovou o primeiro produto de proteína PEGuilada, Adagen®, uma enzima adenosina desaminase PEGuilada para doença de imunodeficiência combinada grave [133]. Desde então, outras terapêuticas com proteínas PEGuiladas foram aprovadas pela FDA para o tratamento de doenças que vão desde artrite reumatóide até degeneração macular relacionada à idade [133]. Uma variedade de medicamentos proteicos peguilados e não proteicos estão clinicamente disponíveis, incluindo vacinas de RNA contra SARS-CoV-2.[134].

O sucesso da PEGuilção de proteínas como um método para produzir terapias intravenosas com circulação mais longa e, portanto, mais eficazes, levou a investigações de PEGuilção de nanopartículas (NP) para aplicações sistêmicas no início dos anos 80 e 90 [135]. Os revestimentos de PEG nas NPs protegem a superfície da agregação, opsonização e fagocitose, prolongando assim o tempo de circulação.

A primeira aprovação da FDA de um produto de nanopartículas PEGuiladas (NP), Doxil®, veio em 1995. Os lipossomas Doxil "Stealth®" aumentaram a biodisponibilidade da doxorubicina em quase 90 vezes em 1 semana a partir da injeção versus medicamento livre, com meia-vida do medicamento de 72 h e meia-vida de circulação de 36 h [136,137].

Nos anos seguintes, a PEGilação tornou-se um pilar na formulação de NP. Embora grande parte do desenvolvimento inicial de NPs PEGuiladas tenha se

concentrado na administração sistêmica, também destacamos os benefícios da PEGuilação de NP para superar barreiras biológicas à entrega eficaz associada a vários modos de entrega, desde injeção no olho até aplicações tópicas na mucosa.

Além das interações de nanopartículas e as barreiras biológicas, o curto tempo de meia-vida de circulação das nanopartículas também pode resultar de interações entre nanopartículas, isto é, agregação. Os NPs agregam-se principalmente porque a atração entre as partículas é mais forte do que a atração pelo solvente [138]. NPs com alta energia superficial têm maior tendência a se agregar, conforme descrito pela teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) [139]. Para NPs esféricas, o potencial de interação está relacionado ao potencial repulsivo eletrostático e ao potencial de atração de van der Waals [139].

O PEG diminui a energia superficial dos NPs e minimiza a atração de van der Waals [140]. O PEG diminui a quantidade de atração entre NPs aumentando a distância estérica entre eles e aumentando a hidrofiliabilidade através de repetições de éter formando ligações de hidrogênio com o solvente. Outros benefícios da PEGuilação incluem a modificação do tamanho da partícula. A redução da filtração renal de partículas maiores que 10 nm, aumentando o tempo de meia-vida de circulação; no entanto, em um tamanho muito grande (> 100 nm), ocorre a captação hepática [141].

### **3.6 Braquiterapia com nanopartículas**

As nanopartículas na braquiterapia representam uma fronteira emergente no tratamento do câncer, oferecendo uma alternativa precisa e eficaz aos métodos convencionais. A incorporação de nanopartículas radioativas permite uma entrega direcionada da radiação, aumentando a eficácia do tratamento e minimizando o dano aos tecidos saudáveis. Esta abordagem inovadora está se mostrando promissora em diversos tipos de câncer, incluindo tumores sólidos desafiadores [142].

O desenvolvimento de nanopartículas para braquiterapia inclui o desafio de garantir estabilidade e distribuição controlada no ambiente biológico. Pesquisas estão em andamento para aprimorar métodos de síntese e entrega de nanopartículas, buscando otimizar a eficácia do tratamento e minimizar os efeitos colaterais. A integração de técnicas de imagem avançadas com a entrega de nanopartículas também estão sendo

investigada, com o objetivo de aprimorar a precisão e o monitoramento do tratamento [143].

Um aspecto crucial do uso de nanopartículas na braquiterapia é o perfil de segurança. Estudos estão focados em entender as interações das nanopartículas com tecidos biológicos e a resposta do organismo a esses materiais. Além disso, a personalização do tratamento com nanopartículas para diferentes tipos de câncer e pacientes é uma área de pesquisa ativa, com o objetivo de maximizar a eficácia e minimizar os riscos [144].

### **3.7 Emprego de nanopartículas radioativas em terapia oncológica.**

A nanotecnologia, emergindo como um campo inovador na medicina, tem um papel crucial, especialmente no tratamento do câncer através da radioterapia. Nanopartículas radioativas, uma fronteira nova na terapia contra o câncer, oferecem uma abordagem refinada para a radioterapia, uma técnica comum no combate a essa doença. Estas nanopartículas têm a notável capacidade de aumentar a eficácia da radiação, direcionando-a de forma precisa aos tumores, o que é essencial para minimizar os danos aos tecidos saudáveis próximos. Este método avançado tem o potencial para superar desafios significativos encontrados nos tratamentos convencionais, incluindo a resistência das células cancerosas à radiação e a redução dos efeitos colaterais adversos, tornando o tratamento mais tolerável para os pacientes [145].

Além disso, o uso de nanotecnologia na radioterapia representa um avanço significativo no tratamento do câncer. Nanopartículas de várias composições, incluindo as metálicas, lipossomas, micelas, poliméricas, de proteínas, cerâmicas, virais e dendrímeros, estão sendo estudadas por sua capacidade única de acumular energia ionizante nos tumores. Esta acumulação se dá através do efeito de permeabilidade e retenção aprimorados (EPR), onde as nanopartículas se acumulam nos tecidos tumorais, aproveitando características vasculares específicas destes tumores. Isso permite que a radiação seja mais eficaz, pois atinge diretamente as células cancerosas, preservando ao máximo os tecidos saudáveis [146].

A crescente pesquisa na utilização de nanopartículas metálicas tem sido notável, devido à sua capacidade de dispersar ou absorver radiações de alta energia, resultando em danos localizados e eficazes às células tumorais. Outros nanomateriais,

como pontos quânticos e óxidos metálicos, também estão sendo explorados para ampliar as possibilidades terapêuticas, abrindo novos horizontes para tratamentos oncológicos mais eficientes e personalizados [146].

No entanto, a aplicação clínica das nanopartículas radioativas ainda enfrenta desafios significativos, como a toxicidade, a biocompatibilidade e a variação nos resultados entre estudos pré-clínicos e clínicos. A superação destes desafios é vital para o progresso e a aplicação bem-sucedida desta abordagem terapêutica em pacientes com câncer. Pesquisas adicionais são necessárias para otimizar as propriedades das nanopartículas, garantindo sua segurança e eficácia a longo prazo [147].

As nanopartículas radioativas apresentam uma diversidade impressionante em suas aplicações no tratamento do câncer. Abaixo há uma descrição de algumas delas:

**Nanopartículas de Ouro (AuNPs):** São produzidas pela redução do tetracloreto de hidrogênio e ouro ( $\text{HAuCl}_4$ ) e destacam-se na radioterapia devido à sua biocompatibilidade e capacidade de aumentar o efeito da radiação nos tumores [148,149].

**Nanopartículas de Gadolínio (GdNPs):** Com alto número atômico, melhoram a eficácia da radioterapia e são rapidamente eliminadas pelos rins, reduzindo efeitos tóxicos [150].

**Nanopartículas de Prata (AgNPs):** Semelhantes às de ouro, são eficazes na radiosensibilização, porém mais acessíveis e com menor biocompatibilidade [151].

**Nanopartículas de Platina:** Usadas em radioquimioterapia, potencializam o dano ao DNA quando associadas à radiação [152].

**Nanopartículas à base de Óxido Metálico:** Incluem óxidos de titânio, háfnio, cerium, entre outros, utilizadas para aumentar a eficácia do tratamento radioterapêutico.

**Nanopartículas de Dióxido de Titânio:** Geram espécies reativas de oxigênio (ROS) quando ativadas por radiação UV, sendo menos eficazes para tumores profundos [153].

**Nanopartículas de Óxido de Háfnio:** Boas para radiosensibilização em radioterapia externa de feixe (EBRT) devido à sua biocompatibilidade e biodistribuição [154].

**Nanopartículas de Óxido de Cério:** Novos agentes de radiosensibilização e entrega de medicamentos, com efeitos proapoptóticos e antioxidantes em certos tipos de câncer [155].

**Nanopartículas de Óxido de Ferro:** Usadas para estresse oxidativo induzido e tratamento de células cancerosas com menor dano a células saudáveis.

Nanopartículas de Óxido de Tântalo: Atuam como radiosensibilizadores, depositando mais energia de radiação nos tumores [156].

Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro: Direcionadas magneticamente para partes específicas do corpo, induzem hipertermia localizada ou entregam agentes específicos [157].

Nanopartículas de Liga Metálica: Utilizadas na terapia de radiação do câncer como potentes radiosensibilizadores [158].

Nanotubos de Carbono: Investigados para aplicações como entrega de medicamentos e imagem biomédica, com potencial para reduzir a resistência à radiação em células tumorais [159].

Nanopartículas à base de Sílica: Testadas para seu papel potencial na radiosensibilização, com nanopartículas de sílica amino-silanizadas oxidadas mostrando maior produção de ROS [160].

Nanopartículas C60: Fullerenos com estrutura globular única que mostram atividades anticancerígenas ao induzir autofagia em células cancerosas [161].

Nanopartículas Poliméricas: Baseadas em polímeros naturais ou sintéticos, melhoram o efeito da radiação ou a entrega de agentes radiosensibilizadores [162].

Cada tipo de nanopartícula apresenta características e mecanismos específicos, tornando-as adequadas para diferentes abordagens no tratamento do câncer.

## 4 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido para a produção de nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoglicol, baseando-se em um método bem aceito e difundido na literatura por Turkevich [163], que utiliza o citrato de sódio com agente redutor. A partir dessa metodologia técnicas de caracterização foram empregadas para avaliar as características físicas e químicas das nanopartículas produzidas. Também se estudou a relação do agente redutor com o tamanho das AuNPs. Após a etapa de produção e caracterização das nanopartículas, testou-se sua citotoxicidade em cinco linhagens celulares, sendo: HUVEC, HEPG2, HTC, BRL3A e HT29-MTX.

### 4.1 Desenvolvimento de síntese de nanopartículas de ouro

#### 4.1.1 Materiais

Para a síntese das nanopartículas de ouro, bem como o seu recobrimento, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ouro (Au-197) pureza mínima de 99,999 % (Ourominas);
- Ácido clorídrico (HCl) 37 % (Dinâmica);
- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65 % (Dinâmica);
- Citrato de sódio tribásico dihidrato (EMSURE Merck);
- Água Ultrapura Tipo I (Millipore, 18.2 MΩ);
- Polietilenoglicol (PEG) 5000 (NH<sub>2</sub>-PEG-SH), Mw 5000 (Laysan BIO);

#### 4.1.2 Dissolução do ouro

Para as etapas de Dissolução do ouro e síntese de nanopartículas de Au-197 e Au-198 foi desenvolvido um sistema fechado de aquecimento com um balão com dois gargalos, um acoplado a um sistema de armadilha (*trap*) de gás, para impedir a entrada de poeira no sistema e outro acoplado a um *trap* de solução de hidróxido de sódio (NaOH) conforme a Figura 3, que impede os gases gerados pela evaporação do ácido clorídrico e ácido nítrico fossem liberados no ambiente juntamente com possíveis particulados de material radioativo.

Figura 3 - Sistema fechado para a produção do ácido cloroáurico. Lado esquerdo da imagem está localizado a armadilha de solução de NaOH (frasco com a tampa azul) ligada ao gargalo lateral do balão. Acoplado ao gargalo superior do balão está a armadilha de gás. O balão foi posicionado a cima de um sistema de aquecimento.



Fonte: Autora da dissertação.

A principal etapa na síntese de AuNPs é reduzir  $\text{Au}^{+1}$  ou  $\text{Au}^{+3}$  para  $\text{Au}^0$ , adicionando um doador de elétrons (agente de redução) na reação. Neste caso utilizou-se o  $\text{HAuCl}_4$  com ouro em seu estado de oxidação  $\text{Au}^{+3}$ .

Para obtenção do reagente de ouro, fez-se necessário que todas as vidrarias fossem limpas adequadamente, lavadas com água régia, enxaguadas com água nanopura e secas. Esta etapa evita a agregação de partícula de ouro residual e nucleação indesejada durante os procedimentos de síntese.

O ouro é oxidado por água régia. Água régia é uma mistura de dois ácidos, o ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) da seguinte forma: O  $\text{HCl}$  fornece seus íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), que reagem com os íons ouro ( $\text{Au}^{3+}$ ) dissociados pelo ácido  $\text{HNO}_3$  para criar ânions tetraclorurato (III), também em solução. A reação com ácido clorídrico é uma reação de equilíbrio que favorece a formação de ânions clorurato ( $\text{AuCl}_4^-$ ).



A remoção do ácido nítrico residual pode ser realizada por aquecimento repetido com adição de ácido clorídrico. O processo apresentado a seguir é um processo adaptado no qual utilizou [164,128]:

1. 11mg de fio de ouro metálico foram adicionados num balão fundo com duas bocas de 50 ml. 1,33 mililitros de água régia (HCl e HNO<sub>3</sub> em uma proporção de volume de 3:1) foram adicionados lentamente sobre o fio;

2. A mistura foi agitada e aquecida a 100 °C. A solução foi reduzida a um terço da solução inicial. Este processo ocorreu em cerca de 15 min;

3. Gradualmente foi adicionado 0,5 ml de HCl a solução aquecida, para auxiliar na eliminação dos vapores nítricos marrons.

4. A solução foi mantida sob aquecimento até ser novamente concentrada para um terço da solução;

5. Os procedimentos descritos nos itens 3 e 4 foram repetidos 5 vezes para auxiliar na evaporação o ácido nítrico. A presença de vapores nítricos foi verificada por uma fita indicadora de pH;

6. Após as cinco repetições de adição de HCl, foi adicionado lentamente à solução 0,5 ml de água ultrapura 3 vezes, para novamente contribuir com a evaporação do ácido nítrico e para manter o pH da solução.

7. O procedimento descrito anteriormente foi repetido 3 vezes. Ao passo que a solução é reduzida a um terço, foi feita uma nova adição.

8. À solução reduzida, foi adicionado 5ml de água ultrapura, mantido sob agitação por mais 5 minutos. Então o sistema de agitação e temperatura foi desligado. Resultando na solução de ácido cloroáurico, pronta para uso.

#### 4.1.3 Síntese de nanopartículas de ouro

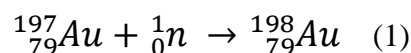
Realizada a partir de uma adaptação do método descrito por Turkevich [163] de síntese de ouro coloidal. A síntese descrita a seguir também foi funcionalizada com Polietilenoglicol 5000 (NH<sub>2</sub>-PEG-SH).

A síntese consistiu em adicionar HAuCl<sub>4</sub> 0,055 mM recém-preparado a 3 ml de água ultrapura, preparado num balão fundo com dois gargalos de 50 ml equipado com um condensador. O A solução foi mantida à ebulição (100 °C) enquanto agitada com uma barra de agitação magnética por dois minutos, ou até que a solução fosse homogênea e de

temperatura estável. Então foi adicionado PEG 0,12 mM e mantido nas mesmas condições para agitação e temperatura por mais três minutos. Em seguida, Na<sub>3</sub>Ctr 39mM foram adicionados rapidamente. Após a adição do agente redutor a solução foi deixada sob agitação durante 3 minutos, em que se observa a mudança de coloração. O frasco foi removido da placa de aquecimento e deixado resfriar por 10 minutos ainda sob refluxo. Após esse período, o sistema de refluxo foi desligado e as análises para caracterização iniciou-se.

## 4.2 Ativação do fio de ouro

O Au-198 foi obtido por uma reação de captura de nêutrons no reator nuclear IEA-R1 do Centro do Reator Nuclear de Pesquisas (CERPq) no IPEN, um reator de pesquisa do tipo piscina com potência máxima de 5MW. O Au-197 possui uma seção de choque de captura de nêutrons de  $98,65 \pm 0,3$  barns o que indica que a probabilidade de obtenção do 198-Au é alta [165,166]. Ao ser irradiado com nêutrons, o Au-197, estável e natural, transmuta no radioisótopo Au-198, respeitando a reação nuclear descrita na Equação 1:



O IEA-R1 opera com potência de 3,5 MW, e a irradiação ocorreu na posição 34B a um fluxo de nêutrons térmicos de  $3,19 \times 10^{13}$  n.cm<sup>2</sup>/s<sup>-1</sup>. Foram irradiados 11mg de ouro-197 e o tempo total de irradiação foi de 2 horas.

O Au-198 por sua vez, decai para o Hg-198, com meia-vida de aproximadamente 2,69 dias conforme demonstrado na figura 1. O decaimento se dá majoritariamente por emissão de β-, porém a emissão de raios γ que acompanham o decaimento.

### 4.2.1 Aferição da atividade das AuNPs-198

O termo câmara de ionização convencionalmente passou a ser usado exclusivamente para o tipo de detector no qual pares de íons são coletados de gases. A

câmara de ionização é o tipo de dosímetro mais utilizado para medições precisas, como as exigidas em radioterapia. Em princípio, são os mais simples de todos os detectores cheios de gás [167]. Sua operação normal é baseada na coleta de todas as cargas criadas pela ionização direta no gás através da aplicação de um campo elétrico. À medida que uma partícula carregada passa rapidamente através de um gás, criam moléculas excitadas e moléculas ionizadas ao longo de seu caminho. Depois que uma molécula neutra é ionizada, o íon positivo resultante e o elétron livre são chamados de par iônico e servem como constituinte básico do sinal elétrico desenvolvido pela câmara iônica. Independentemente dos mecanismos envolvidos na criação do par iônico, a quantidade prática de interesse é o número total de pares de íons criados ao longo do trajeto da radiação.

À medida que é aplicada uma diferença de tensão entre as paredes da câmara (onde se encontra o ânodo) e o eletrodo coletor (o cátodo), um campo elétrico é gerado no interior da câmara. Se o campo elétrico for suficientemente alto para evitar a perda de carga devido à recombinação dos íons positivos e dos elétrons, uma condição de saturação iônica é alcançada. Então, as cargas resultantes deslocam-se conforme a polaridade gerando uma corrente elétrica, a corrente medida é simplesmente proporcional à taxa de formação de carga dentro da câmara iônica e é proporcional à intensidade da radiação incidente naquele volume [168].

Para a aferição da atividade das AuNPs-198 foi utilizado a câmara de ionização tipo poço da marca Capintec modelo CRC®-15W que pertence ao CETER do IPEN. Foram aferidas as atividades do ouro metálico ativado (antes da síntese das AuNPs), da 198-AuNPs (logo após a síntese). Para evitar contaminação do poço, tanto o Au-198 (ouro metálico), quanto as AuNPs-198 foram alocadas em um frasco de vidro NPL-P6, e este recipiente foi colocado em um invólucro de filme plástico.

#### 4.2.2 Espectrometria gama do Au-198 por detecção no germânio hiperpuro.

O detector de Germânio Hiperpuro (HPGe) utiliza um cristal semiconductor, que quando sofre a incidência de um fóton, faz com que ocorra uma cascata de elétrons entre as bandas de valência para a de condução, gerando assim um sinal de corrente elétrica que possibilita definir a energia característica do fóton incidente [168]. Para realizar a espectrometria gama utilizou-se o HPGe modelo GEMC5970-B conectado ao

sistema de resfriamento LN2 dewar Möbius da marca ORTEC, que pertence ao CETER do IPEN.

A caracterização espectral foi realizada usando o software MAESTRO 7 Multichannel Analyzer Emulation Software da AMETEK, e a literatura de referência [169]. O detector foi calibrado com fontes de calibração de  $^{137}\text{Cs}$  (césio) e  $^{133}\text{Ba}$  (bário) ambas de  $10\ \mu\text{Ci}$  da marca Amershan. A medida do Au-198 metálico(fio) foi realizado antes da realização da síntese das NPs para a confirmação da presença do radioisótopo desejado. O espectro das AuNPs-198 obtidas também foi avaliado, este após a realização da síntese.

### **4.3 Caracterização das nanopartículas de ouro**

As propriedades físico-químicas dos nanomateriais contribuem para o seu comportamento no meio biológico [170,171], tornando-se propriedades importantes devido às incertezas que muitas vezes são atribuídas a fatores físicos (por exemplo, tamanho de partícula [172], carga de superfície [173], forma [174] e químicos (por exemplo, funcionalização de superfície com diferentes ligantes, incluindo PEGilação [131]). Sendo assim, a caracterização adequada das NPs é essencial para a obtenção de dados confiáveis e torna segura sua aplicação no meio biológico.

A seguir, aborda-se as técnicas de caracterização físico-química das nanopartículas produzidas.

#### **4.3.1 Definição da concentração do agente de nucleação**

Com base em parâmetros fisiológicos como filtração hepática, extravasamento tecidual, difusão tecidual e excreção renal, fica claro que, juntamente com a composição da superfície, o tamanho das partículas é um fator chave na biodistribuição de nanopartículas de longa circulação e na obtenção de eficácia terapêutica [141].

A partir dos dados de Turkevich e G. FRENS [175] é possível concluir que a redução do cloreto de ouro com citrato de sódio em solução aquosa é um procedimento

promissor para a preparação de tal conjunto de suspensões de ouro monodispersas com diâmetros de partículas amplamente diferentes. Assim, alterando as quantidades relativas de reagentes, nos informa sobre as mudanças nas taxas relativas dos dois processos independentes de nucleação e crescimento das partículas metálicas. Se o ouro disponível for dividido em mais ou menos núcleos existe uma diferença considerável no diâmetro das partículas resultantes.

Uma série de suspensões monodispersas com a mesma composição química, mas com tamanhos de partículas bastante diferentes, podem ser utilizadas para estudar fenômenos dependentes do tamanho das partículas, como movimento browniano, dispersão de luz, sedimentação e eletroforese de pequenas partículas. Usou-se um procedimento padrão para obter a suspensão monodispersa de AuNPs é o seguinte. São preparadas soluções de  $\text{HAuCl}_4$  (0,055 mM, solução I) e de citrato de sódio (39mM, solução II). 1,0 ml da solução I é aquecida até à ebulição e 1 ml da solução II é adicionada, a cada série variou-se a quantidade da solução II. Em cerca de 25 s, a solução em ebulição torna-se ligeiramente azul (nucleação). Após aproximadamente 70 s, a cor azul muda repentinamente para um vermelho brilhante.

#### 4.3.1 Espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta

O Espalhamento de Luz Dinâmico, do inglês *Dynamic Light Scattering* (DLS), utiliza um laser monocromático e coerente que incide nas nanopartículas, espalhando a luz em todas as direções [176]. O espalhamento apresenta uma variação devido ao movimento aleatório das partículas obtido da colisão com as demais partículas do meio (movimento browniano), resultando em interferência construtiva ou destrutiva. Isso permite a quantificação da flutuação e o perfil de distribuição do tamanho das partículas.

O sistema de potencial Zeta mede a carga da superfície por meio da magnitude das forças de repulsão e atração entre as partículas [177,178].

As medidas de DLS e de potencial Zeta foram realizadas no equipamento da Anton Paar Litesizer 500 disponível no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER) IPEN, como visto na figura 4. Antes das medições, a temperatura foi estabilizada pelo equipamento a 25°C por 60 segundos antes das medidas.

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi obtido pelo DLS em diferentes momentos para avaliar se houve aglomeração com o passar do tempo. As medidas foram realizadas em 0,5 hora, 24 horas e 10 dias após a produção das AuNPs não radioativas e radioativas. As medidas foram realizadas com nanopartículas já recobertas. Também foi avaliado o índice de polidispersão, que forneceu informações sobre a homogeneidade da distribuição das nanopartículas desenvolvidas em relação ao seu tamanho.

Para as medidas de potencial Zeta utilizou-se uma cubeta do tipo Ômega Z da Anton Paar. As medidas também foram realizadas 0,5 hora, 24 horas e 10 dias após a produção das AuNPs.

Figura 4 – Equipamento utilizado para as medidas de DLS e potencial Zeta juntamente com a cubeta utilizada para a medida de potencial Zeta.



Fonte: Catálogo Anton Paar Disponível em <<https://www.anton-paar.com/br-pt/produtos/detalhes/litesizer/>>. Acesso em: 10 nov. 2023.

#### 4.3.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis)

O espectro de absorção no UV-Vis realiza a medida de absorbância na região do espectro ultravioleta (100 - 400 nm) e visível (400 – 800 nm) dos materiais. Nessas faixas de energia as moléculas sofrem transições eletrônicas moleculares que são características de cada material. A quantidade de luz que é absorvida pelo material depende da sua concentração, do coeficiente de absorção molar e do caminho óptico da luz. Com isso, esta técnica permite determinar, por exemplo, curvas de titulação, substâncias químicas e biológicas quantitativamente, grau de pureza de compostos entre outros [177].

Para avaliação do espectro UV-Vis das nanopartículas de ouro foi realizado uma varredura de 400 nm a 700 nm no espectrofotômetro Shimadzu UV- 1800, pertencente ao Centro de Tecnologia das Radiações (CETER) IPEN ilustrado na figura 5 utilizando-se uma cubeta de 10 mm de poliestireno.

O espectro UV-Vis de absorvância da ressonância da superfície plasmônica das AuNPs pode ser usado para estimar o tamanho do núcleo das NPs com base na interação da luz com este núcleo de ouro utilizando-se a seguinte equação para diâmetros menores de 35 nm:

$$d = e^{\left(B_1 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2\right)} \quad (2)$$

Onde,  $B_1$  é o inverso da inclinação ( $m$ ) do ajuste linear  $B_2 = B_0/m$  onde  $B_0$  é a interceptação.  $A_{spr}$  é a absorvância das AuNPs no pico de ressonância da superfície plasmônica e  $A_{450}$  é a absorvância a 450 nm [178].

Figura 5 - Equipamento utilizado para as medidas de UV-Vis.



Fonte: Autora da dissertação.

#### 4.3.3 Análises microscópicas (MET)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utiliza um feixe de elétrons como fonte de “iluminação” sobre uma amostra a ser observada. Esta

incidência de elétrons produz diversas interações passíveis de serem coletadas fazendo estas técnicas irem muito além da simples obtenção de imagens. Instrumentos de microscopia eletrônica modernos oferecem um grau detalhado de caracterizações estruturais, espectroscópicas, composicionais e cristalográficas, em diferentes materiais tais como metais, ligas metálicas, cerâmicas, semicondutores, vidros, polímeros, madeira, têxteis, concreto, amostras biológicas, etc.

Na técnica de MET, o feixe de elétrons interage com uma amostra suficientemente fina à medida que a atravessa. A amostra é disposta entre a fonte de elétrons e um anteparo, onde a imagem ampliada é formada pelo impacto dos elétrons transmitidos e difratados. A imagem gerada é uma projeção bidimensional da amostra, em campo claro ou escuro, ou ainda de difração de elétrons, dependendo do modo de operação do equipamento [179].

A avaliação da distribuição de tamanho e morfologia dos núcleos das AuNPs foi realizada utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para esta análise, 10  $\mu$ l da solução de AuNPs foi gotejada sobre uma grade de cobre recoberta de carbono e seca em um ambiente à vácuo.

O microscópio utilizado para obter as imagens está disponível na Central Analítica do Instituto de Química da USP modelo MET JEOL JEM 2100, como mostrado na figura 6.

As medidas do diâmetro médio das AuNPs foram realizadas utilizando-se o programa ImageJ desenvolvido pelo National Institute of Health (NIH) [180]. Para a medida do diâmetro médio das AuNPs foi realizada a medida de 500 partículas, em 26 capturas de imagem, na magnificação de 130.000 vezes.

Figura 6 - Equipamento de avaliação da distribuição de tamanho e morfologia dos núcleos das AuNPs. Microscópio eletrônico de transmissão.



Fonte: Central Analítica, Instituto de Química - USP Disponível em <[https://ca2.iq.usp.br/paginas\\_view6375.html?idPagina=16](https://ca2.iq.usp.br/paginas_view6375.html?idPagina=16)>. Acesso em: 10 nov. 2023.

#### 4.4 Ensaio de citotoxicidade

Este ensaio tem como objetivo avaliar a resposta de diferentes linhagens celulares à exposição *in vitro* às nanopartículas de ouro PEG (AuNPs PEG). As linhagens celulares selecionadas incluem as hepáticas tumorais HepG2 e HTC, a hepática normal BRL3A, a tumoral de cólon HT29-MTX e a de endotélio HUVEC, esta última utilizada como controle. O objetivo é compreender os efeitos das NPsAu PEG nas células, estabelecendo um pré-requisito crucial para futuros testes *in vivo*, conforme descrito por NEL, Andre et al., 2006. O ensaio de citotoxicidade foi seguido de acordo com o protocolo descrito por De Souza et al. 2022 e Barbezan et al. 2024, com algumas modificações adaptadas para este estudo específico.

##### 4.4.1 Materiais e Reagentes Utilizados.

- Linhagem celulares: Todas adquiridas através do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), HepG2 (Linhagem tumoral de fígado humano) HTC (Linhagem

tumoral de Fígado de Rato), BRL3-A (Linhagem de Fígado Normal de rato), HT-29 MTX (Adenocarcinoma Colorretal Humano) e HUVEC (do inglês human umbilical vein endothelial cells ou células endoteliais de veia umbilical humana);

- Frasco de Cultura: T75 (Cralplast);
- Tubos de Centrifugação: Tipo Falcon 15 e 50 mL (Cralplast);
- Placa de Petri: PS 60X15MM (Cralplast);
- Meio de Cultura: RPMI-1640 (Gibco);
- Suplementos para Cultura: Soro fetal bovino (SFB - Gibco) e Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich);
- Microplacas: Placas de 96 poços Costar®;
- Reagentes para Descolamento Celular: Tripsina-EDTA (Gibco);
- Solução de Lavagem: Solução salina tamponada com fosfato DPBS 1x (Dulbecco);
- Solvente para Controles: DMSO - Dimetilsulfóxido PA (Dinâmica);
- Solução Azul de Tripán: 0,4% em PBS (Nova Biotecnologia).

#### 4.4.2 Cultivo celular

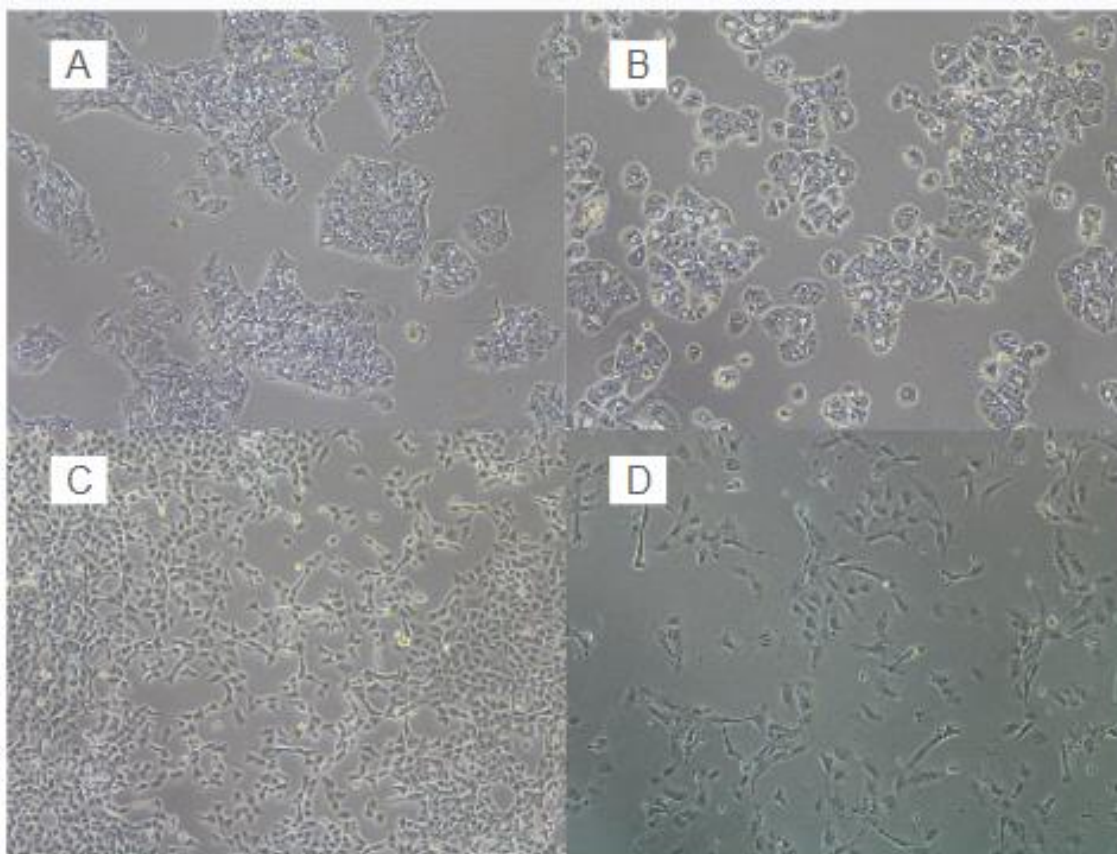
O objetivo principal deste procedimento é preparar as linhagens celulares (HUVEC, HepG2, HTC, BRL3A e HT29-MTX) para os ensaios de citotoxicidade. Inicialmente, as células foram recuperadas do armazenamento em nitrogênio líquido, descongeladas em temperatura ambiente e transferidas para garrafas de cultura (T75). O meio de cultivo utilizado foi o RPMI 1460® (Gibco), enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 1% de solução antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich).

A manutenção das células ocorreu três vezes por semana. Quando as células atingiram aproximadamente 40% de confluência, as garrafas foram lavadas com DPBS para remover células não aderidas e meio residual, e o RPMI foi repostado antes de retornar as garrafas à estufa. Uma vez que a confluência chegou a cerca de 80%, as células passaram por tripsinização, um processo essencial para a passagem das células. Este processo envolveu a lavagem das células com DPBS, seguida pela adição de tripsina e incubação por 5 minutos para descolar as células. Após a observação de descolamento celular, o meio de cultura foi adicionado para neutralizar a tripsina. Uma parte das células

foi descartada e o restante foi mantido em novo meio de cultura RPMI. As células foram então retornadas à estufa.

Antes de serem semeadas em placas de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade, as células passaram por três ciclos de tripsinização para garantir sua estabilidade e adequação ao meio de cultura. Este cuidado assegura a validade dos resultados dos ensaios subsequentes. Adicionalmente, na figura 7, podemos observar a morfologia das linhagens utilizadas neste estudo, fornecendo uma visualização direta das características celulares pertinentes ao nosso experimento.

Figura 7 - Morfologia das linhagens celulares utilizadas (A) HEPG2; (B) HT29 MTX; (C) HTC; (D) BRL3A próximas ao estado de confluência, obtida pelo microscópio invertido Nikon EclipseTS 100, acoplado a um módulo de excitação por LED Lumencar® Mira Light Engine (4-NII-FA).



Fonte: Autora da dissertação.

#### 4.4.3 Avaliação da esterilização das AuNPs PEG

Antes da utilização das nanopartículas em ensaio *in vitro*, estas precisam estar estéreis, pois pode ocorrer contaminação e conseqüentemente morte celular prejudicando o resultado do estudo.

Deste modo, após a produção, as AuNPs PEG foram submetidas ao processo de esterilização utilizando o irradiador multipropósito de Cobalto-60, do CETER. Elas foram submetidas a uma dose de 25kGy, que é efetiva para esterilização ou inativação de microrganismos indesejáveis.

Para verificar se o método de esterilização das AuNPs foi eficiente, antes de serem adicionadas às células, foram testadas duas concentrações diferentes de AuNPs, distribuídos em duas placas de petri descartáveis, adicionando 3 ml de meio de cultura em cada uma. Em seguida 300 µl (10%) de AuNPs foram adicionados a uma placa, e 150µl (5%) em outra. Ambas mantidas na estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas.

#### 4.4.4 Ensaio de viabilidade celular

##### 4.4.4.1 Ensaio de viabilidade celular não radioativo

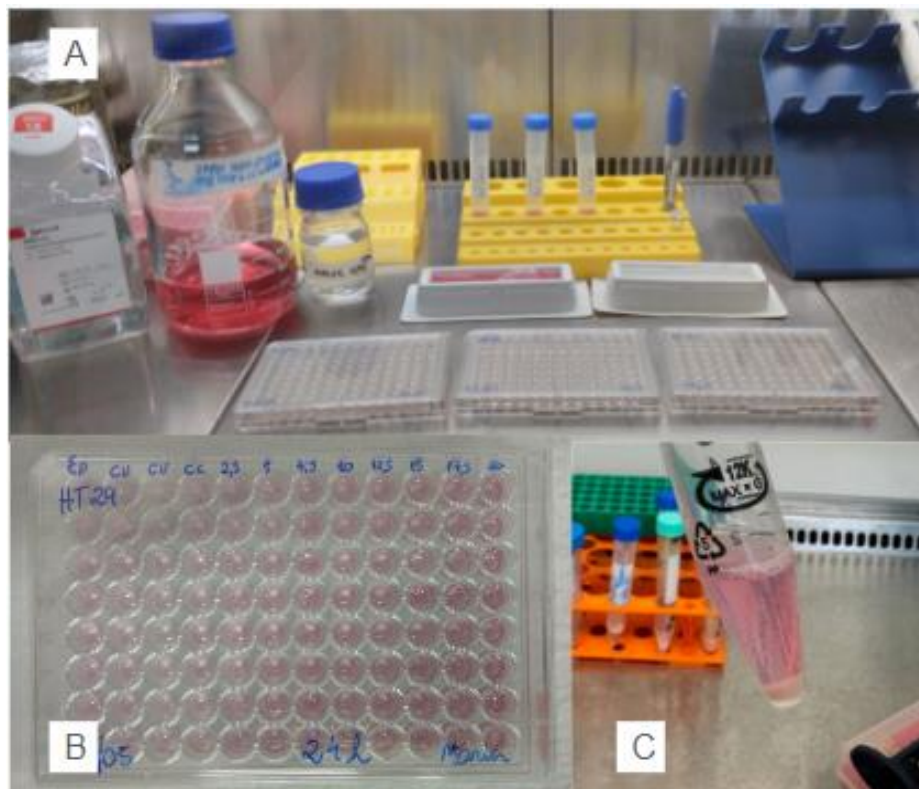
Após a terceira passagem, as células nas garrafas foram preparadas para a tripsinização. Inicialmente, as garrafas foram lavadas com 5 ml de solução DPBS para remover resíduos de meio e células não aderidas. Em seguida, adicionou-se 3 ml de tripsina e as garrafas foram colocadas na estufa por aproximadamente 5 minutos. A verificação de que as células haviam se despreendido foi feita visualmente. Para neutralizar a ação da tripsina, adicionou-se 7 ml de meio de cultura à solução, que em seguida foi transferida para um tubo cônico.

A suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, resultando na formação de um pellet celular, como ilustrado na Figura 8. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 3 ml de meio de cultura. Para a contagem de células, retirou-se 20 µl dessa suspensão e misturou-se com 20 µl de solução de azul de tripan. Esta mistura foi homogeneizada e, em seguida, 10 µl da solução foram colocados sob uma lamínula de vidro em uma câmara de Neubauer. A contagem celular foi realizada sob um microscópio, auxiliada por um contador manual, permitindo a estimativa precisa da concentração celular.

As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, cada placa correspondendo a um período de incubação específico. Em cada poço, foram semeadas  $5.0 \times 10^3$  células, resultando em um volume final de 100  $\mu$ l. As condições de incubação mantidas foram 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após este período inicial, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com 100  $\mu$ l de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS), seguido da adição de um novo meio de cultura.

Para avaliar o efeito das nanopartículas de ouro (AuNPs PEG) sobre as células, diferentes concentrações foram testadas: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 (Valores expressos em  $\mu$ l). Cada concentração foi analisada em oito repetições, o que pode ser referido como octuplicata. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando uma microplaca de 96 poços, organizada em 12 fileiras e 8 colunas. A distribuição dos tratamentos e controles na placa foi meticulosamente planejada, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - (A) Materiais utilizados para o plaqueamento: DPBS, meio de cultura RPMI, NaCl a 0,9%, 3 placas de 96 poços para os três períodos de estudo 6, 24, 48 horas, DMSO, H<sub>2</sub>O e barquinhas estéreis para fazer a distribuição de meio e DPBS para lavagem; (B) placa com 96 poços 12 colunas x 8 fileiras, sendo dividida em controle positivo (CP), controle negativo (CN), controle de veículo (CV), controle de células (CC) e os tratados com 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 ml; (C) pellet de células formado após a centrifugação.



Fonte: Autora da dissertação.

Os controles foram dispostos da seguinte maneira:

- Primeira fileira: Controle Positivo - consistindo em 10% de DMSO para estabelecer uma referência de citotoxicidade máxima.
- Segunda fileira: Controle Negativo - utilizando 5% de NaCl, representando uma condição isotônica sem efeito citotóxico esperado.
- Terceira fileira: Controle de Veículo - contendo 20% de Água (H<sub>2</sub>O) para avaliar qualquer efeito do solvente utilizado.
- Quarta fileira: Controle de Células - apenas células e meio de cultura, para monitorar o crescimento celular normal.

Após o período de incubação designado, os meios contendo os tratamentos e controles foram cuidadosamente aspirados de cada poço. Seguiu-se a lavagem com 100 µl de DPBS, e após uma nova aspiração, 120 µl da solução MTS/PMS foram adicionados em cada poço. Esta solução foi preparada de acordo com as instruções do kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Para permitir a reação, a placa foi incubada por um período adicional de 2 a 4 horas.

Ao término do tempo de incubação com o reagente colorimétrico MTS/PMS, as placas foram submetidas à leitura utilizando um leitor de microplacas específico para ensaios de ELISA. A absorvância foi medida a 490 nm utilizando um leitor de placas Multiskan EX (Thermo Scientific) como na Figura 9. Este procedimento permitiu a quantificação da viabilidade celular em resposta aos diferentes tratamentos com nanopartículas de ouro (AuNPs PEG).

Para a análise estatística dos dados obtidos, utilizou-se o software Microsoft Excel, versão 16.76, para a organização e manipulação preliminar dos dados. Em seguida, uma análise mais detalhada foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) unidirecional para determinar a significância estatística das diferenças observadas entre os grupos. Em casos em que diferenças significativas foram identificadas pela ANOVA, o teste de Bonferroni foi aplicado como um procedimento pós-teste para identificar quais grupos específicos diferiam significativamente entre si.

Este protocolo meticuloso e a análise estatística rigorosa garantiram a confiabilidade e a validade dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade das AuNPs PEG.

Figura 9 – Equipamento utilizado para a leitura das microplacas testes de ELISA. Multiskan EX (Thermo Scientific).



Fonte: Autora da dissertação.

#### 4.4.4.2 Ensaio de viabilidade celular radioativo

Em complemento aos ensaios de citotoxicidade não radioativos, foram conduzidos estudos paralelos utilizando nanopartículas radioativas (AuNPs-198 PEG) nas mesmas linhagens celulares (HepG2, HTC, BRL3A e HT29 MTX). Durante a fase de plaqueamento para o ensaio radioativo, adotou-se uma estratégia diferenciada para minimizar as interferências de irradiação entre os poços. Uma placa separada foi dedicada exclusivamente para os controles, incluindo: Controle Positivo (DMSO), Controle Negativo (NaCl) e Controle Celular (CC). Esta abordagem visou prevenir que a radiação emitida pelos poços tratados pudesse afetar o desenvolvimento das células nos poços de controle. Optou-se por não realizar o teste de controle do veículo neste ensaio, uma vez que já havia sido demonstrada sua eficácia nos testes não radioativos.

Na microplaca de tratamento, foram testadas três concentrações distintas de  $^{198}\text{AuNPs}$  PEG: 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{l}$ . A disposição dos poços tratados foi planejada para ser espaçosa, com o intuito de reduzir qualquer potencial influência da radiação emitida de poços adjacentes.

Com base nos dados obtidos no estudo de citotoxicidade não radioativo, constatou-se que concentrações de nanopartículas de ouro (AuNPs) acima de 7,5  $\mu\text{l}$  induziam efeitos citotóxicos nas células. Diante deste achado, optou-se por limitar as concentrações de AuNPs PEG no ensaio radioativo a 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{l}$ . Estas concentrações

foram correlacionadas às atividades radioativas de 0.8, 1.6 e 2.4  $\mu\text{Ci}$ , respectivamente. Esta abordagem foi estrategicamente planejada para garantir que eventuais efeitos deletérios observados nas células pudessem ser claramente atribuídos à radiação proveniente das AuNPs-198 PEG, e não à toxicidade intrínseca das nanopartículas em si. A seleção dessas concentrações permitiu uma avaliação precisa do impacto da radiação nas células, sem a interferência da citotoxicidade direta das AuNPs.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados serão estruturados em três partes principais. A primeira detalha a síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com PEG; a segunda parte foca na caracterização físico-química das AuNPs PEG incluído análise de amostras não radioativas (AuNPs-197 PEG) quanto aquelas radioativas (AuNPs-198 PEG); e a terceira e última parte explora os resultados dos ensaios de viabilidade celular para AuNPs-197 e AuNPs-198 ambas funcionalizadas com PEG.

### **5.1 Síntese de nanopartículas de ouro**

O processo para a produção das nanopartículas que foi usado neste trabalho, levou em consideração a síntese com o material radioativo. Deste modo, os aparatos para a síntese foram esquematizados para diminuir o impacto ambiental, os riscos ocupacionais e a toxicidade para o ser humano durante a produção do nanomaterial.

A primeira etapa necessária para a síntese das AuNPs foi a obtenção do ácido cloroáurico. Após a produção do ácido cloroáurico, este foi avolumado para uma concentração de 0,05 mM, seguiu-se para a reação de redução do ouro e obtenção das NPs. No balão, foram colocados a solução de ouro, a água e o PEG e foi mantido sob agitação por 5 minutos. Neste momento a coloração é levemente amarelada, depois disso o citrato foi adicionado a reação. Após a adição do redutor, percebe-se que a solução passa instantaneamente para uma coloração transparente, vinho escuro, parando em uma coloração vermelha.

Também foi observado que o grupo tiol (SH) presente no recobrimento utilizado neste trabalho possui alta afinidade com o ouro, formando uma ligação covalente, o que em geral resulta em soluções coloidais mais estáveis [36,37].

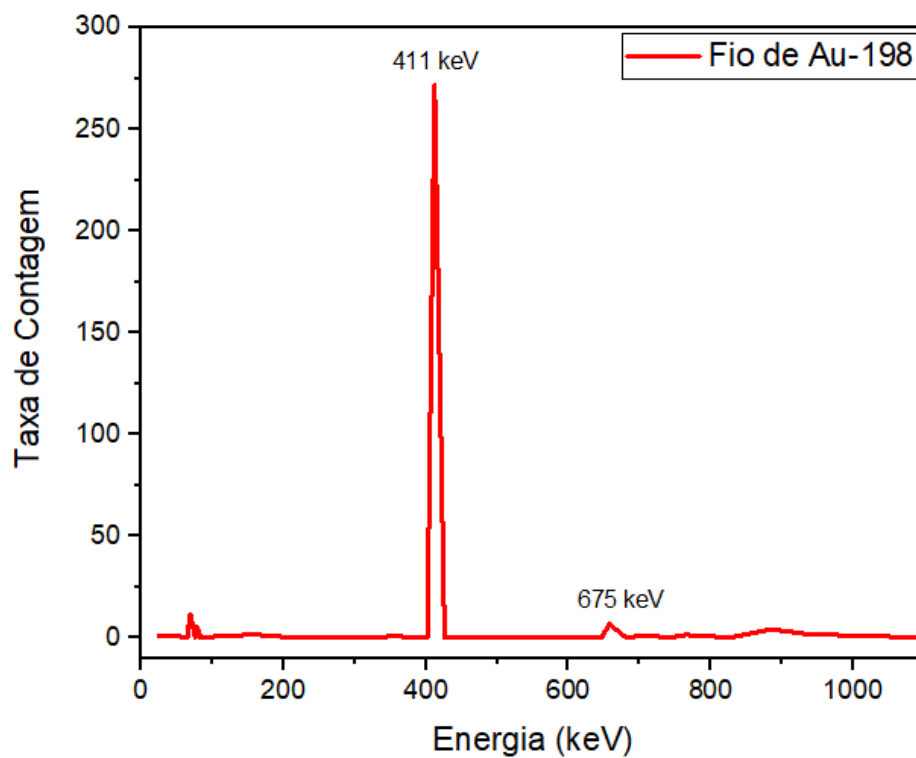
### **5.2 Aferição da atividade e Espectrometria gama do Au-198**

As reações para a obtenção das AuNPs-198 apresentaram atividade de  $671 \mu\text{Ci} \pm 5 \mu\text{Ci}$ , (para um volume final de cada reação de 4,25 mL), o valor da atividade esperado para as reações, baseada na atividade do ouro dissolvido seria de  $791 \mu\text{Ci}$ , a diferença entre o valor teórico e o valor experimental foi de 1,74%. Este resultado demonstra, juntamente com as medidas do diâmetro hidrodinâmico, que a síntese realizada apresentou boa reprodutibilidade.

Após a ativação do Au-197 em Au-198, confirmou-se a pureza do radionuclídeo com a espectrometria gama realizada com um detector HPGe, antes da realização das sínteses das AuNPs. A atividade do Au-198 no momento inicial desta medida estava relativamente alta (128 mCi), não permitindo a leitura adequada devido ao alto tempo morto. O alto tempo morto pode afetar a eficiência na separação de contagem no sistema de detecção, ocasionando uma sobrecarga na leitura e aumentando a probabilidade de que um evento verdadeiro seja perdido [64]. Então, em um primeiro momento esperou-se que a atividade diminuísse e que assim o fio, a solução de ácido cloroáurico e a solução de nanopartículas pudesse ser lida. Posteriormente, após a passagem de 6 meia-vidas (16 dias), realizou-se a espectrometria gama com um fragmento do Au-198 metálico ( $\mu\text{Ci}$ ) para a obtenção de seu espectro.

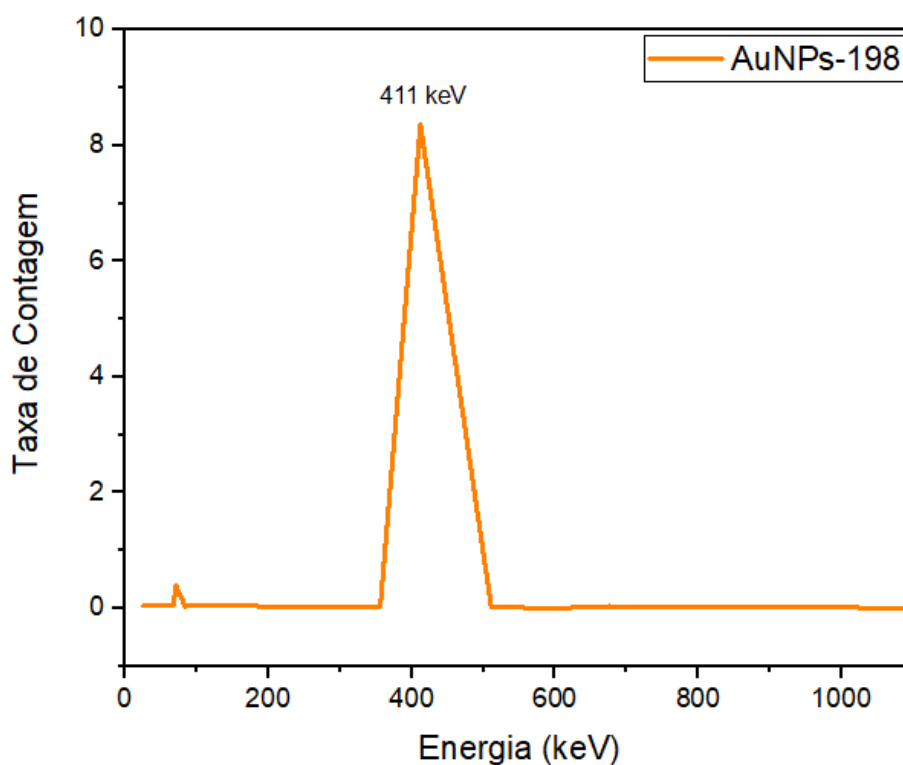
Após a realização das sínteses para a obtenção das 198-AuNPs, realizou-se espectrometria gama. A atividade média das AuNPs ( $671 \mu\text{Ci} \pm 5 \mu\text{Ci}$ ) possibilitou a leitura da amostra posicionada junto ao detector. O tempo vivo de leitura para cada amostra, foi de 7200 segundos. Os espectros obtidos do ouro metálico e das AuNPs-198 estão apresentados respectivamente na figura 10 e 11.

Figura 10 - Espectro de radiação gama obtidos do Au-198 metálico.



Fonte: Autora da dissertação.

Figura 11 – Espectro de radiação gama obtidos das AuNPs-198 obtidas.



Fonte: Autora da dissertação.

Como pode ser observado, tanto no espectro do ouro metálico, como nos espectros da AuNPs é possível verificar a presença dos picos característicos do Au-198,

confirmando-se assim, que tanto o ouro metálico foi ativado, bem como as AuNPs obtidas permaneceram com os picos característicos do Au-198.

### 5.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

As sínteses das nanopartículas não radioativas e radioativas ocorrem de forma análoga. Desse modo, apenas a análise feita por DLS em relação ao tamanho e a estabilidade das nanopartículas foi realizada, pois para as demais análises não foi permitido o uso do equipamento com amostras radioativas, por segurança do próprio equipamento.

#### 5.3.1 Definição da concentração do agente de nucleação

Para selecionar o melhor tamanho e estabilidade das nanopartículas foi feita uma variação no volume adicionado de citrato de sódio como agente de redução. A suspensão monodispersa com partículas menores e com partículas maiores foram obtidas pelo mesmo procedimento, sendo a única alteração na quantidade de citrato adicionada conforme na tabela 2. Foi possível observar também a variação na coloração das soluções de AuNPs seguindo na figura 12.

Tabela 2 – Alteração do diâmetro hidrodinâmico relacionado a quantidade de citrato.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade de Sol. de Citrato (ml)</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico (nm)</b>	<b>Desvio Padrão (nm)</b>
<b>A</b>	1,20	22,90	0,60
<b>B</b>	1,00	35,93	0,58
<b>C</b>	0,80	67,96	1,11
<b>D</b>	0,60	99,01	2,61
<b>E</b>	0,40	136,38	4,39

Fonte: Autora da dissertação.

As menores partículas obtidas desta forma tinham um diâmetro de 22,90 nm. O diâmetro médio nas suspensões mais grossas foi de 136,38 nm, obtida com 0,40 ml. da solução de citrato. A estes níveis baixos de citrato os resultados são menos reprodutíveis e a ebulição tem de continuar durante pelo menos 30 min para completar a reação, além disso após a produção as partículas tendem a se aglomerarem. A concentração de citrato no procedimento padrão é tal que a formação global das partículas prossegue tão rapidamente quanto possível.

Figura 12 – Variação da coloração da solução de AuNPs seguindo a Tabela (A) 22,90 nm com 1,2ml de Sol. de Cit. apresenta uma coloração avermelhada, (B) 35,93 nm com 1 ml de Sol. de Cit., (C) 67,96 nm, (D) 99,01 nm, (E) 136,38 nm, sendo a de coloração amarelada uma solução de H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>.



Fonte: Autora da dissertação.

Para selecionar a quantidade de citrato e conseqüentemente o tamanho reprodutível, além da pesquisa na literatura, foram realizadas medidas por DLS e espectrometria UV-visível onde o mais adequado volume de solução de citrato encontra-se na sessão seguinte.

### 5.3.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

Os resultados dessas análises forneceram o perfil de distribuição de tamanho das nanopartículas, a estabilidade e a carga de superfície quando submetidas a testes no decorrer de 0,5 hora, 24 horas e 10 dias após sua produção.

Cada momento de medida foi feito em triplicata. A tabela 3 demonstra os valores médios dos diâmetros hidrodinâmico das AuNPs e seus respectivos desvios padrão. A figura 13 mostra o perfil de monodisperso de distribuição das NPs ao longo do tempo.

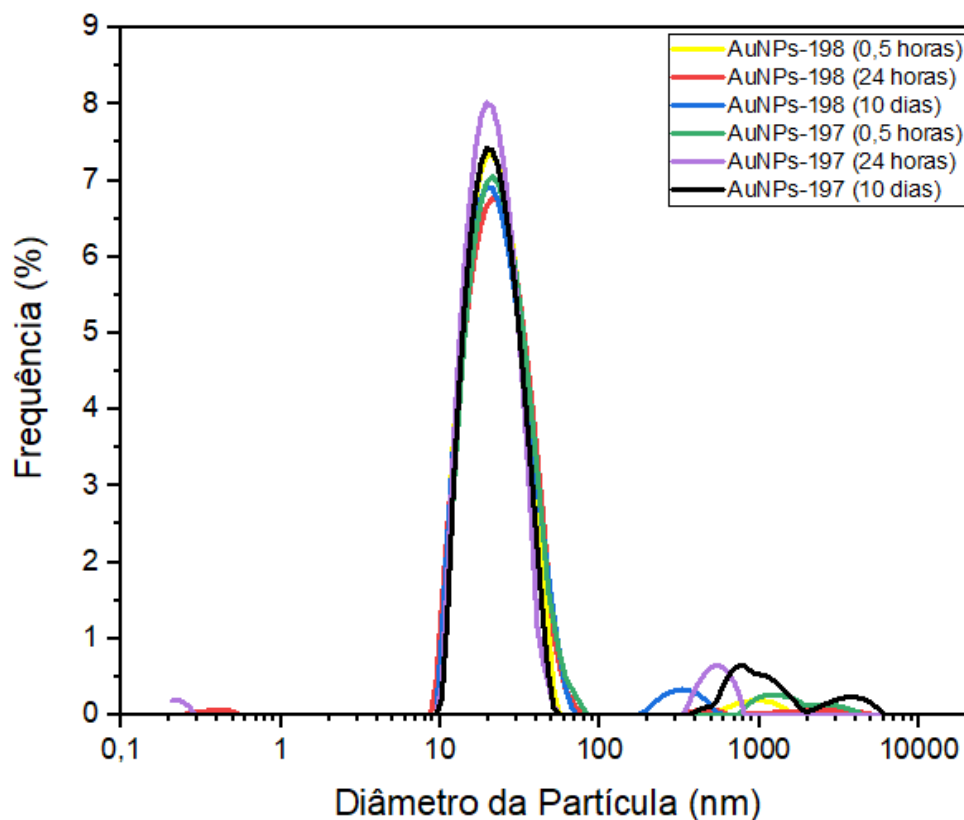
Tabela 3 - Comparação do diâmetro de AuNPs-198 PEG e AuNPs-197 PEG ao longo do tempo.

	<b>Tempo após a preparação</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico (nm)</b>	<b>Índice de Polidispersão (%)</b>	<b>Desvio Padrão (nm)</b>	<b>Desvio Padrão (%)</b>
<b>Au-197</b> (não radioativa)	0,5 hora	22,9037	22,7435	0,6070	0,6592
	24 horas	21,6533	16,8134	0,9705	3,8324
	10 dias	23,3136	21,1793	0,9517	4,2489
<b>Au-198</b> (radioativa)	0,5 hora	21,6326	18,6310	0,3327	3,7579
	24 horas	21,8454	19,0791	0,2749	1,5697
	10 dias	24,3283	24,3783	0,4796	0,2352

Fonte: autora da dissertação.

Quando comparados os valores do diâmetro e seus respectivos índices de polidispersão das nanopartículas não radioativas (Au-197) e radioativas (Au-198), estes não apresentam diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ). Além disso, como pode ser observado na figura 13 e na tabela 3, as AuNPs-197 e AuNPs-198 houve um aumento da polidispersão e diminuição do diâmetro total nas 198-AuNPs após 10 dias da reação não foram significativos ( $p > 0,05$ ) quando comparados aos valores de 0,5 hora e 24 horas. Indicando que o procedimento feito a frio, não radioativo, foi reprodutível quando feito a quente, ou seja, de forma radioativa.

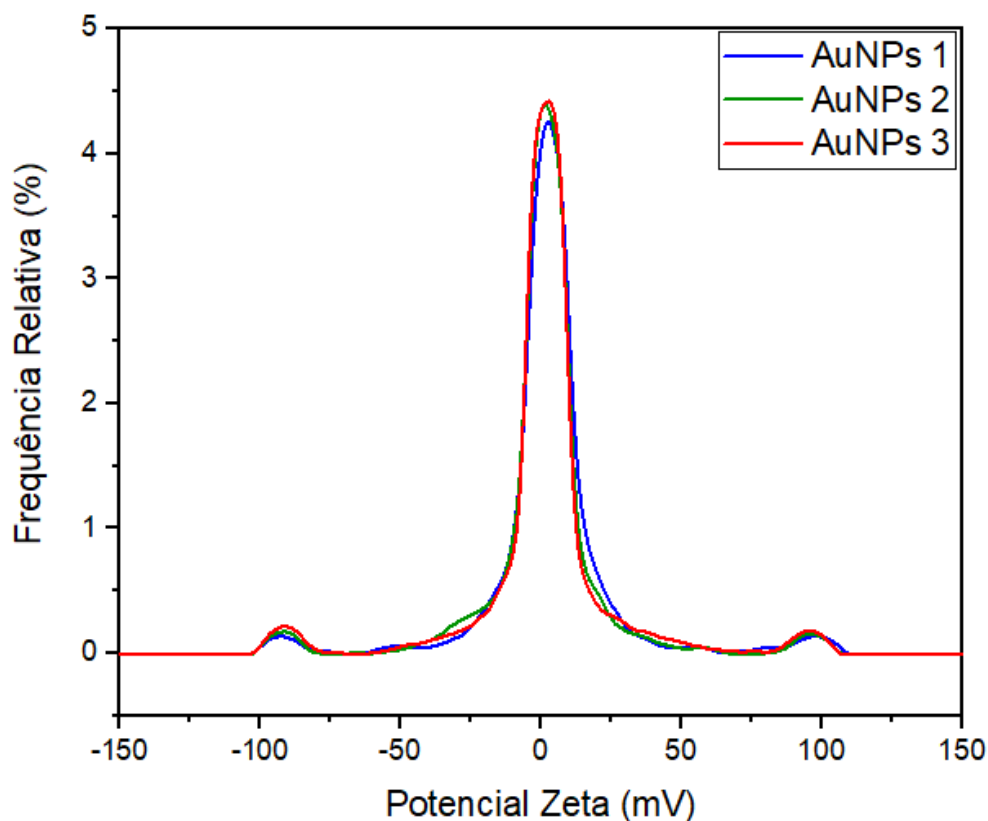
Figura 13 – Perfil de distribuição das AuNPs-197 (não radioativas) e AuNPs-198 (radioativas) ambas testadas em três períodos de 0,5 h, 24 h e 10 dias após serem produzidas.



Fonte: Autora da dissertação.

O potencial Zeta médio das AuNPs-197 foi de  $-0,1269$  mV com desvio padrão de  $0,0634$  mV, este resultado pode ser explicado pelo fato de que o recobrimento com PEG que é eletricamente neutro e acaba por atenuar as cargas negativas do redutor citrato de sódio, uma vez que a medida é realizada na superfície das NPs [38-43]. A literatura ainda indica que a alteração no potencial Zeta pode indicar forte interação do PEG com as AuNPs, este resultado é corroborado com a manutenção do tamanho hidrodinâmico das AuNPs ao longo do tempo como foi evidenciado através da figura 14 [38].

Figura 14 - Função de distribuição de potencial zeta em triplicata para AuNPs-197 PEG.

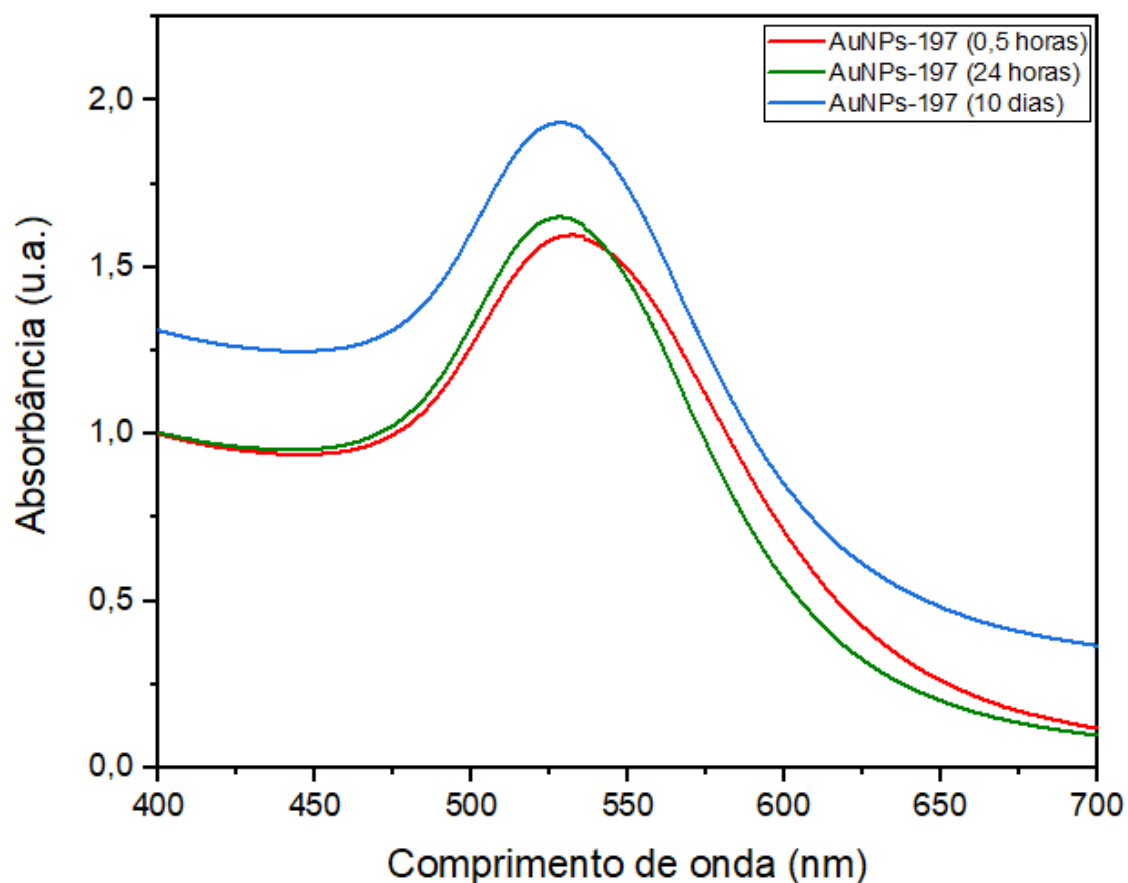


Fonte: Autora da dissertação.

### 5.3.3 Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis)

Na figura 15 é apresentado os espectros UV-Visível obtidos para as AuNPs não radioativas. Os resultados mostraram que as AuNPs-197 apresentaram um pico de absorbância médio de 530 nm. Sendo  $B_1 = 3,55$ ,  $B_2 = 3,11$ ,  $A_{spr} = 1,5$  e  $A_{450} = 0,94$  o tamanho calculado do núcleo das nanopartículas foi de 12,61 nm. Houve uma pequena variação no pico de absorbância em 10 dias, porém não apresenta diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ), confirmando uma boa estabilidade da nanopartícula produzida. A espectroscopia UV-Visível e bem como as medidas de potencial zeta foram realizadas somente nas AuNPs- 197 para evitar contaminação dos instrumentos e laboratórios com o material ativado.

Figura 15 - Espectros UV-Visível das AuNPs-197 ao longo do tempo.

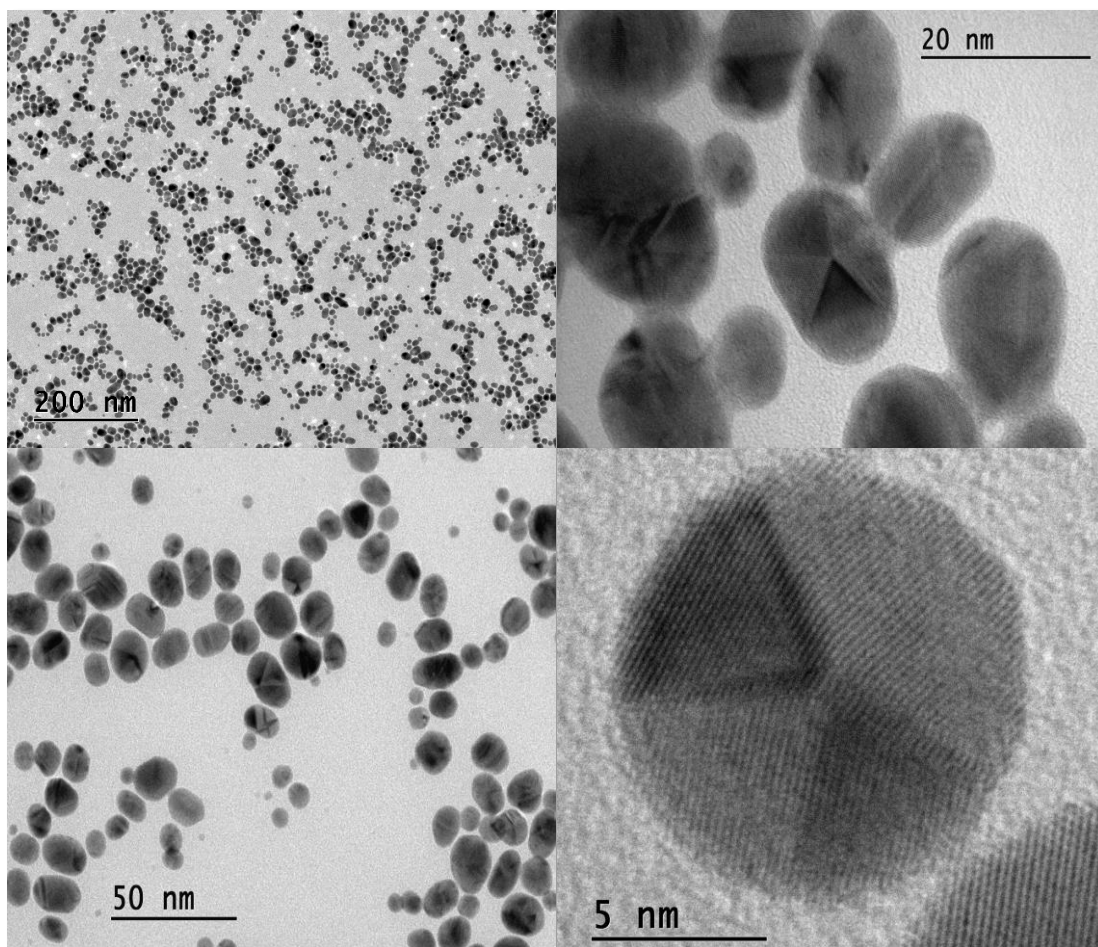


Fonte: Autora da dissertação.

#### 5.3.4 Análises microscópicas (MET)

Para avaliar a forma e tamanho das nanopartículas de ouro produzidas pela síntese desenvolvida neste trabalho, foi feita a análise por MET das AuNPs-197 com PEG 5000. Na figura 16 são apresentadas as micrografias obtidas em diferentes magnificações.

Figura 16 - Micrografias obtidas por TEM nas AuNPs-197 funcionalizadas com PEG 5000 em diferentes magnificações.



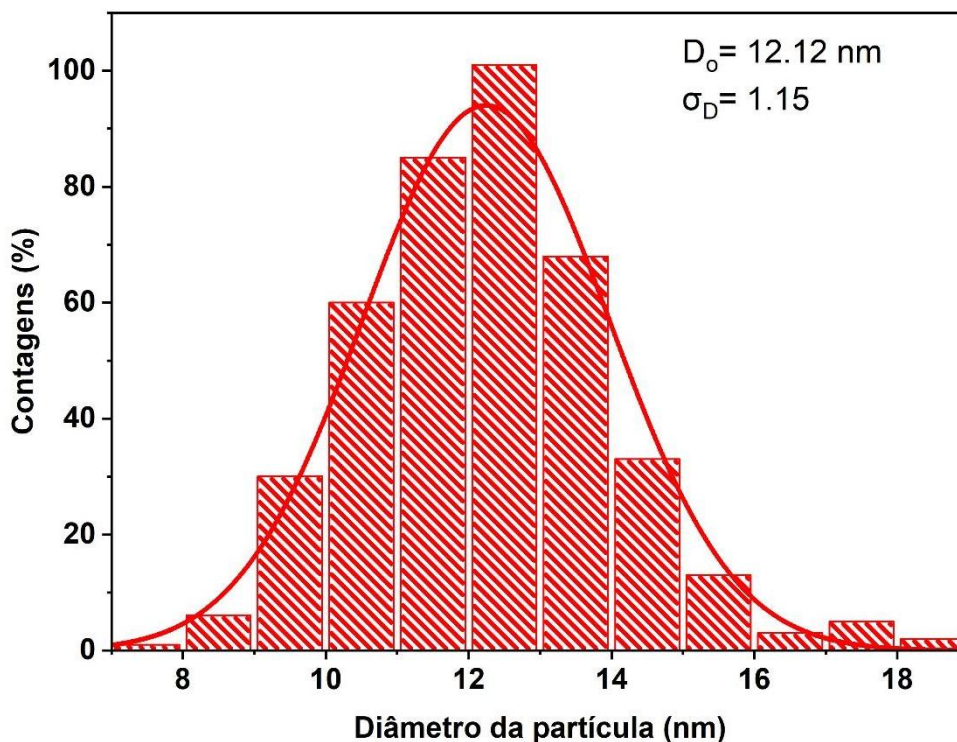
Fonte: Autora da dissertação.

As micrografias apresentadas na figura 16, revelaram que as nanopartículas possuem formato esférico, e não apresentam grandes pontos de aglomerações de partículas, o que indica boa dispersão na suspensão de AuNPs-197. Foram observados poucos pontos acumulados de matéria orgânica, o que pode indicar que não houve excesso de recobrimento nas AuNPs-197 com PEG.

A análise da distribuição de tamanho das AuNPs-197 pelas micrografias (figura 16) revelou que o diâmetro médio das NPs foi de 12,12 nm. Na figura 17 ainda é possível observar que a maior frequência do diâmetro das AuNPs-197 está entre 11 e 12 nm. Onde  $D_0$  corresponde ao tamanho médio das partículas e  $\sigma_D$  é o desvio padrão. A função de ajuste lognormal é dada por:

$$f(D) = \left( \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_D}} \right) \exp \left[ -\frac{\ln^2 \frac{D}{D_0}}{2\sigma^2} \right] \quad (3)$$

Figura 16 – Distribuição de tamanho de partícula com ajuste de função de distribuição log normal.



Fonte: Autora da dissertação.

## 5.4 Ensaio de viabilidade celular.

### 5.4.1 Avaliação da esterilidade das AuNPs-197

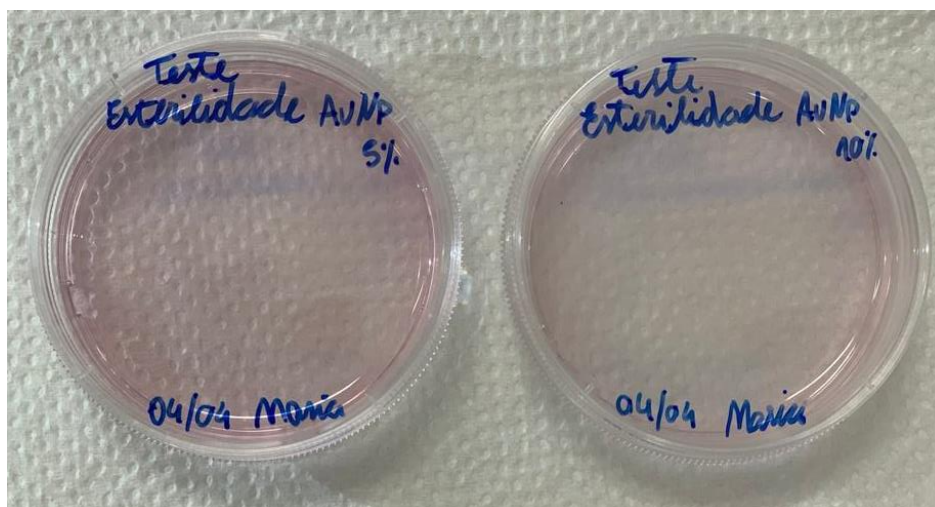
As nanopartículas (AuNPs PEG) foram submetidas a um processo de esterilização, sendo incubadas em diferentes concentrações (5% e 10%) por um período de 48 horas. Este procedimento foi crucial para assegurar a eficácia do método de esterilização, garantindo que os efeitos observados no ensaio de viabilidade celular fossem atribuídos exclusivamente ao tratamento com as NPsAu PEG, e não a uma potencial contaminação microbiana.

Conforme ilustrado na figura 18, o método de esterilização demonstrou-se eficaz. Observou-se que o meio de cultura permaneceu translúcido ao longo do período

de incubação, indicando ausência de turbidez típica de contaminação bacteriana. Além disso, análises microscópicas subsequentes confirmaram a ausência de proliferação de microrganismos, corroborando a eficácia da esterilização.

Com base nesses resultados, foi possível prosseguir com o ensaio de citotoxicidade, assegurando a integridade e a confiabilidade dos dados coletados. Este passo foi fundamental para garantir que os resultados do teste de viabilidade celular refletissem de maneira precisa a resposta celular às AuNPs PEG, sem interferências externas decorrentes de contaminação.

Figura 18 - Teste de esterilidade das AuNPs-197 PEG.



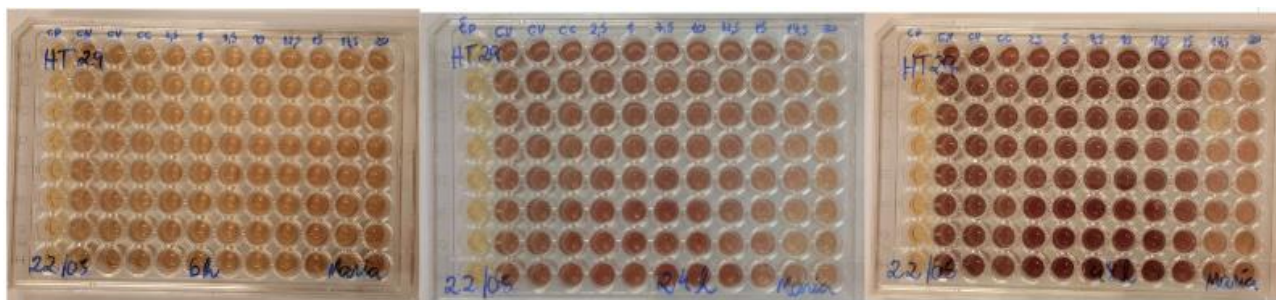
Fonte: Autora da dissertação.

#### 5.4.2 Viabilidade celular com AuNPs-197

Como dito na metodologia, após a aplicação da solução MTS/PMS que foi adicionada 120  $\mu$ l em cada poço. Após este procedimento a placa retornou para a incubadora e esperou-se de 2 a 4 horas para que a solução pudesse corar as células vivas. O resultado obtido depois deste período de espera, pode ser observado na figura 19.

Figura 19 – Avaliação dos efeitos após incubação: a primeira imagem à esquerda ilustra o resultado após 6h de tratamento com as AuNPs PEG, destacando-se a coloração amarelada no controle positivo, indicativo de maior mortalidade celular. A imagem central representa a condição após 24h do tratamento, onde se observa-se a intensificação da coloração amarelada tanto no controle positivo quanto nas maiores concentrações de nanopartículas (17,5 e 20  $\mu$ l). A imagem a direita, corresponde a 48h após o tratamento nos padrões similares aos de 24h, com a

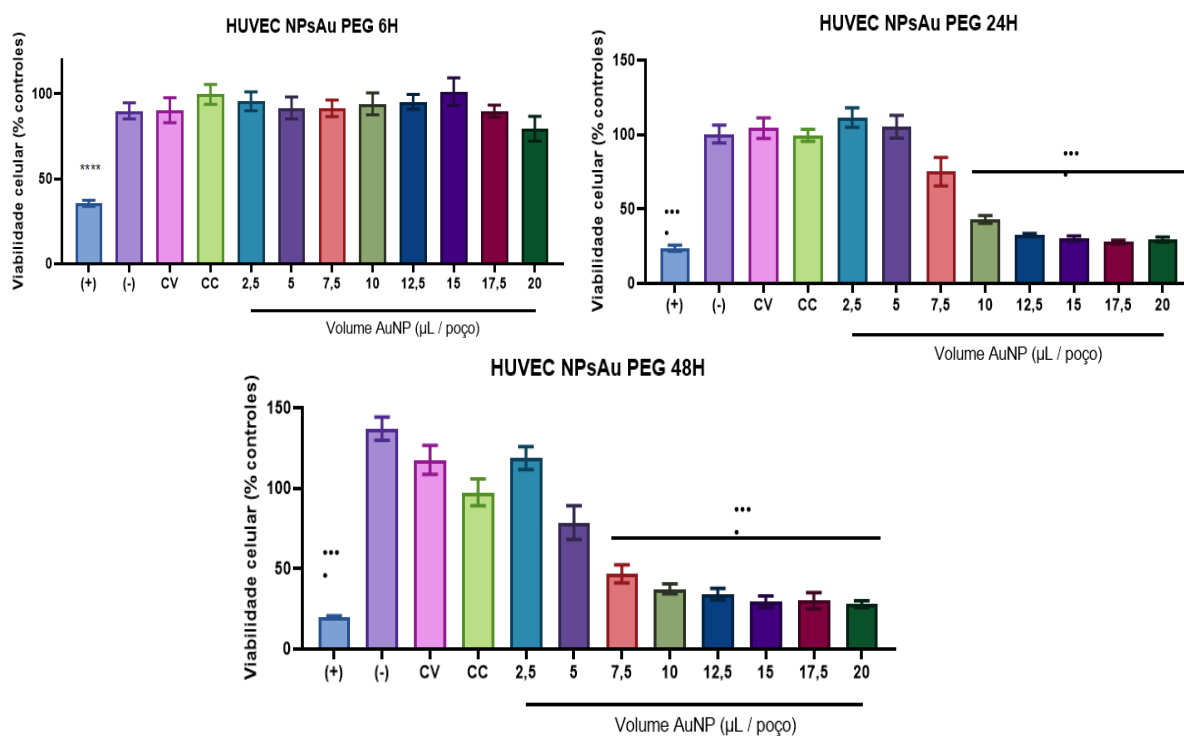
adição de que as concentrações de 2,5 à 15  $\mu\text{l}$  apresentam um tonalidade marrom mais pronunciada.



Fonte: Autora do seminário.

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade das AuNPs PEG na linhagem de endotélio HUVEC, HTC, HT29 MTX, HepG2 e BRL3A apresentou diferenças significativas entre as células tratadas com diferentes concentrações de 2.5 a 20  $\mu\text{l}$  de NPs quando comparadas ao controle, em praticamente todas as concentrações. Os estudos estatísticos mostraram citotoxicidades como mostrado nas Figuras 20 a 24.

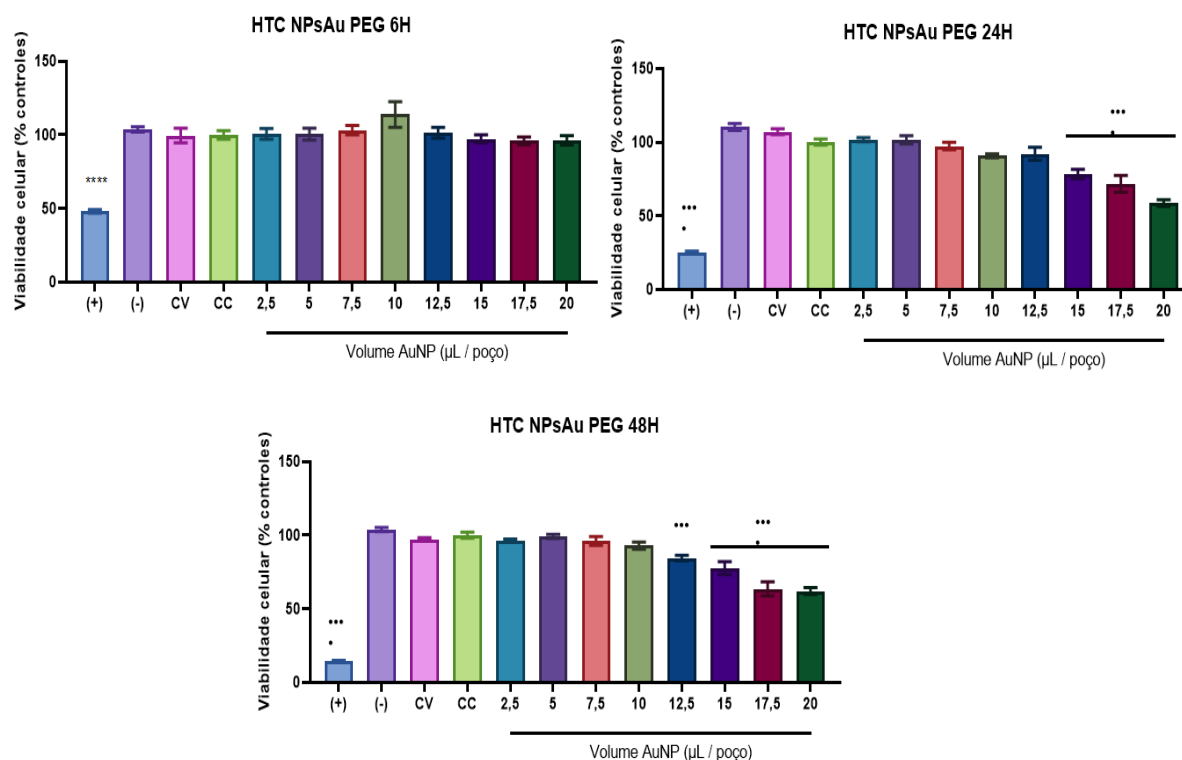
Figura 20: Avaliação da citotoxicidade em células HUVEC submetidas ao teste com AuNPs-197. Os três gráficos mostram as respostas celulares ao longo de três períodos distintos (6h, 24h, e 48h) evidenciando as variações da viabilidade celular.



Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 20 apresenta um gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células HUVEC após exposição a concentrações incrementais de NPsAu-197 (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20  $\mu\text{L}$ ). O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que não houve alteração significativa nas diferentes concentrações em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC). O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 100% com 2,5  $\mu\text{l}$  e apresentou redução significativa, a partir de 7,5  $\mu\text{l}$  a 20  $\mu\text{l}$ . O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 100% a 2,5  $\mu\text{l}$ , seguido por uma diminuição a partir de 5  $\mu\text{l}$  em diante. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-197 em células HUVEC.

Figura 21 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linhagem celular HTC.

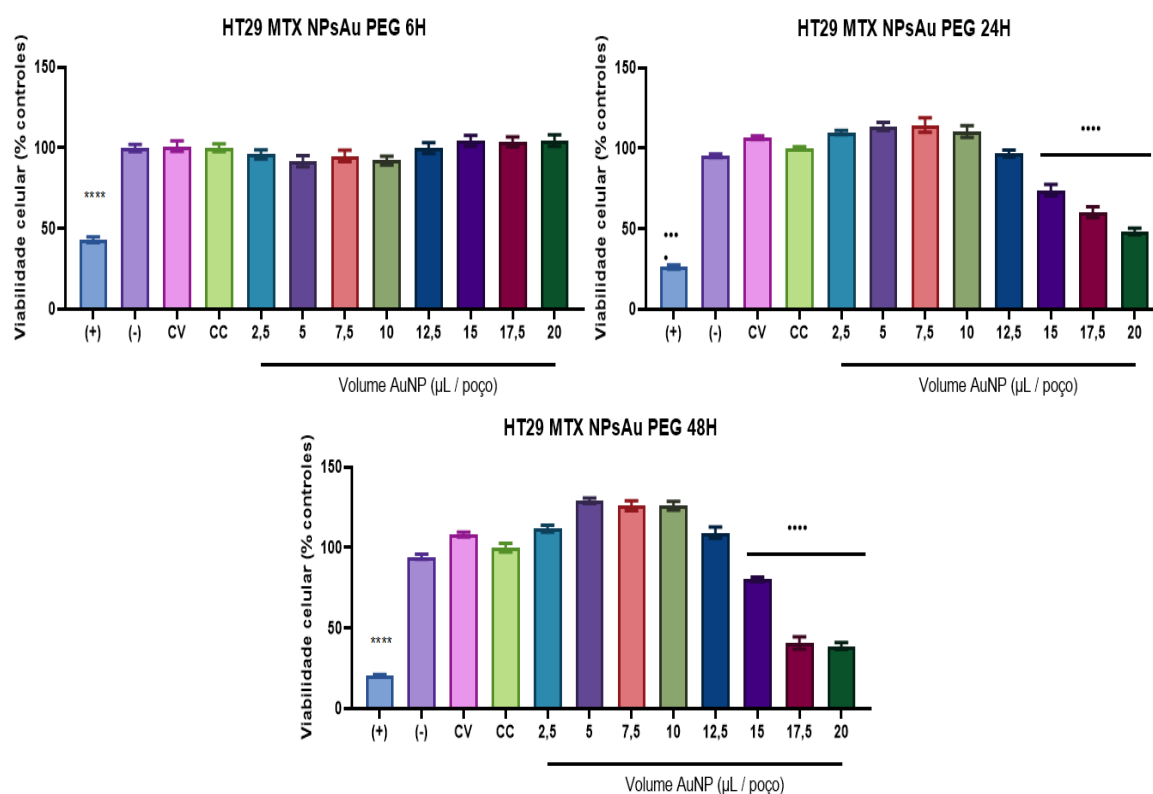


Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 21 apresenta um gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células HTC após exposição a concentrações incrementais de NPsAu-197 (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20  $\mu\text{l}$ ). O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que não houve alteração nas diferentes concentrações em relação a morte

celular quando comparada com o controle de células (CC). O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 100% com 2,5  $\mu\text{l}$  e apresentou redução significativa, a partir de 15  $\mu\text{l}$  a 20  $\mu\text{l}$ . O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 95% a 2,5  $\mu\text{l}$ , seguido por uma diminuição a partir de 12,5  $\mu\text{l}$  em diante. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-197 em células HTC.

Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linhagem celular HT29 MTX.

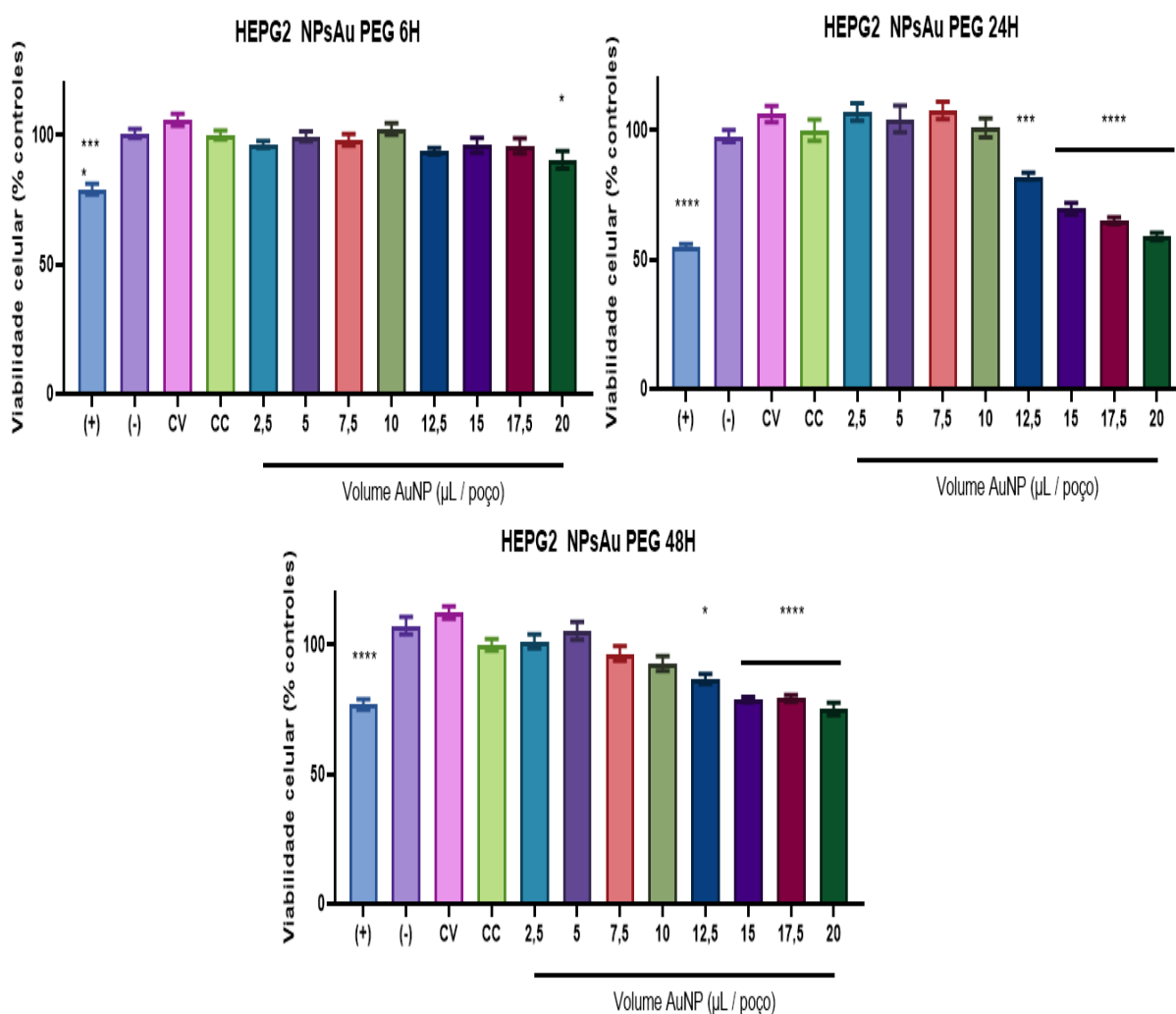


Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 22 apresenta um gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células HT29 MTX após exposição a concentrações incrementais de NPsAu-197 (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20  $\mu\text{l}$ ). O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que não houve alteração nas diferentes concentrações em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC). O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 100% com 2,5  $\mu\text{l}$  e apresentou redução significativa, a partir de 15  $\mu\text{l}$  a 20  $\mu\text{l}$ . O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade

inicial em torno de 100% a 2,5  $\mu\text{l}$ , seguido por uma diminuição a partir de 12,5  $\mu\text{l}$  em diante. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-197 em células HT29 MTX.

Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linhagem celular HepG2.

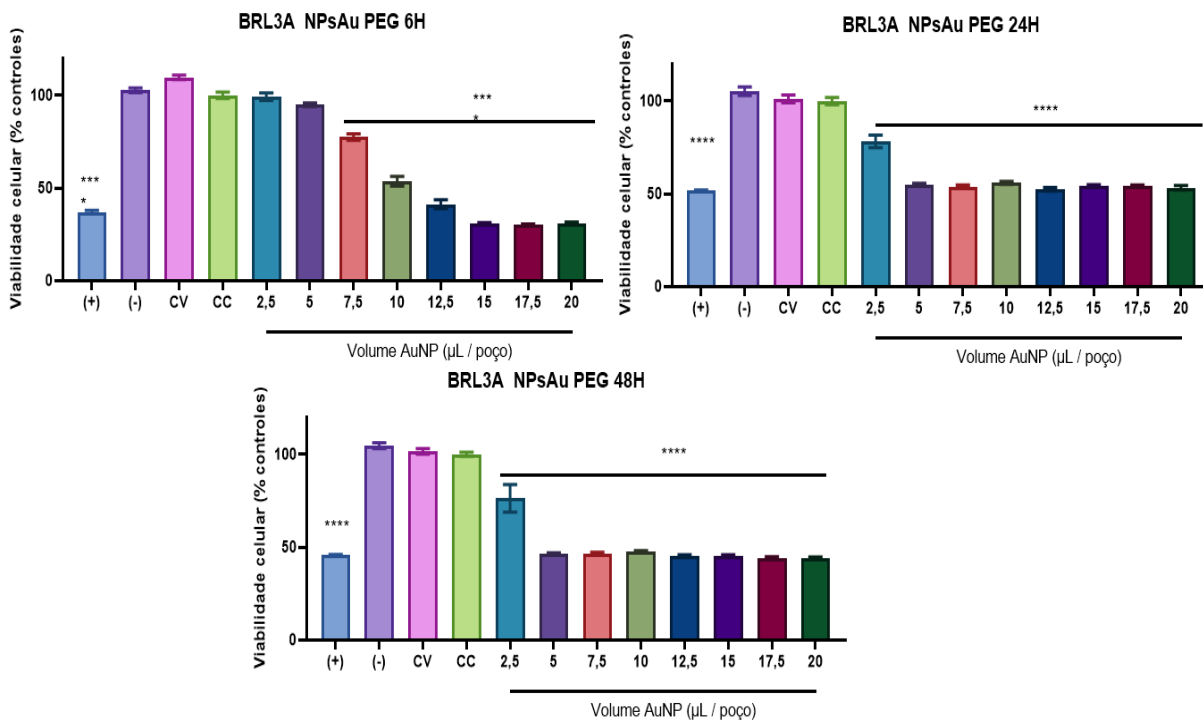


Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 23 apresenta um gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células HepG2 após exposição a concentrações incrementais de NPsAu-197 (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20  $\mu\text{l}$ ). O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que não houve alteração nas diferentes concentrações em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC). O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 100% com 2,5  $\mu\text{l}$  e apresentou redução

significativa, a partir de 12,5  $\mu$ l a 20  $\mu$ l. O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 100% a 2,5  $\mu$ l, seguido por uma diminuição a partir de 12,5  $\mu$ l em diante. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-197 em células HepG2.

Figura 24 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linha celular BRL3A.



Fonte: Autora da dissertação.

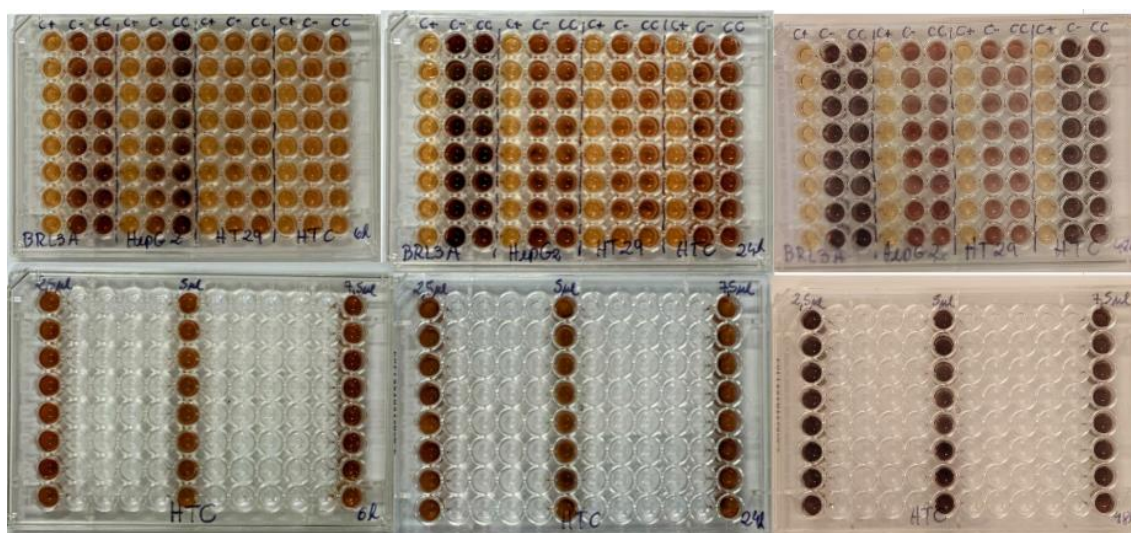
A Figura 24 apresenta um gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células BRL3A após exposição a concentrações incrementais de Au-197 (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20  $\mu$ l). O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que houve alteração nas diferentes concentrações em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC) iniciando em 7,5  $\mu$ l a 20  $\mu$ l, evidenciando a morte celular nas primeiras 6 h. O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 78% com 2,5  $\mu$ l e apresentou redução significativa, a partir dessa concentração a 20  $\mu$ l. O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 76% a 2,5  $\mu$ l, seguido por uma diminuição até 20  $\mu$ l. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-197 em células BRL3A.

### 5.4.3 Viabilidade celular com AuNPs-198

Considerando os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade com AuNPs-197, constatou-se que concentrações de nanopartículas de ouro acima de 7,5  $\mu\text{l}$  induziam efeitos citotóxicos na maioria das células testadas. Por esse motivo optou-se por limitar as concentrações de AuNPs PEG no ensaio radioativo a 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{l}$ .

A Figura 25 mostra as placas após 2 a 4 horas que a solução de MTS/PMS foi aplicada.

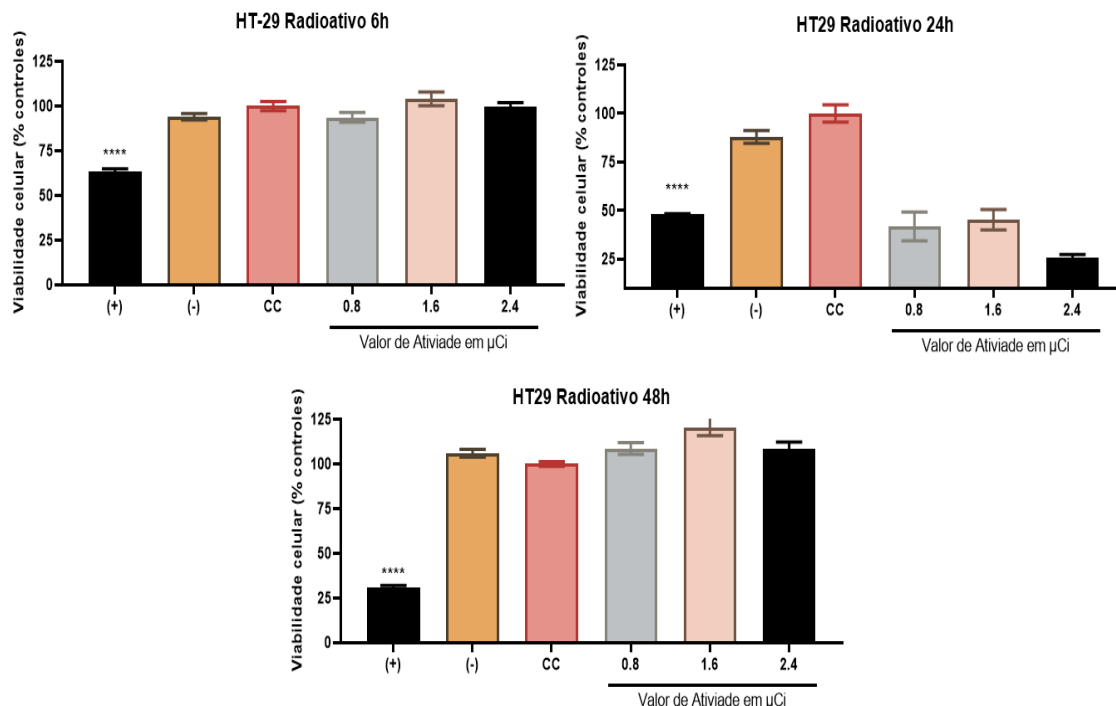
Figura 25 – Controles (C+, C- e CC) utilizados nas linhagens BRL3A, HepG2, HT29 MTX e HTC após 6, 24 e 48 horas de tratamento. As imagens inferiores exibem o grupo tratado com AuNPs-198 na linhagem de célula HTC. A primeira à esquerda (6h de incubação) mostra coloração tendendo ao marrom, sugerindo mínima morte celular. A imagem central (24h de incubação) revela um tom mais amarelado, indicando possível morte celular. A última imagem à direita (48h de incubação) contrasta o controle com o tratado, evidenciando similaridade na viabilidade celular. Sugere uma ausência de morte celular significativa, alinhando-se estritamente com os resultados do controle.



Fonte: Autora da dissertação.

Para os testes com nanopartículas radioativas, foram testadas concentrações de AuNPs-198 que apenas apresentaram resultados quando submetidas à AuNPs-197 como visto nas Figuras de 26 a 30.

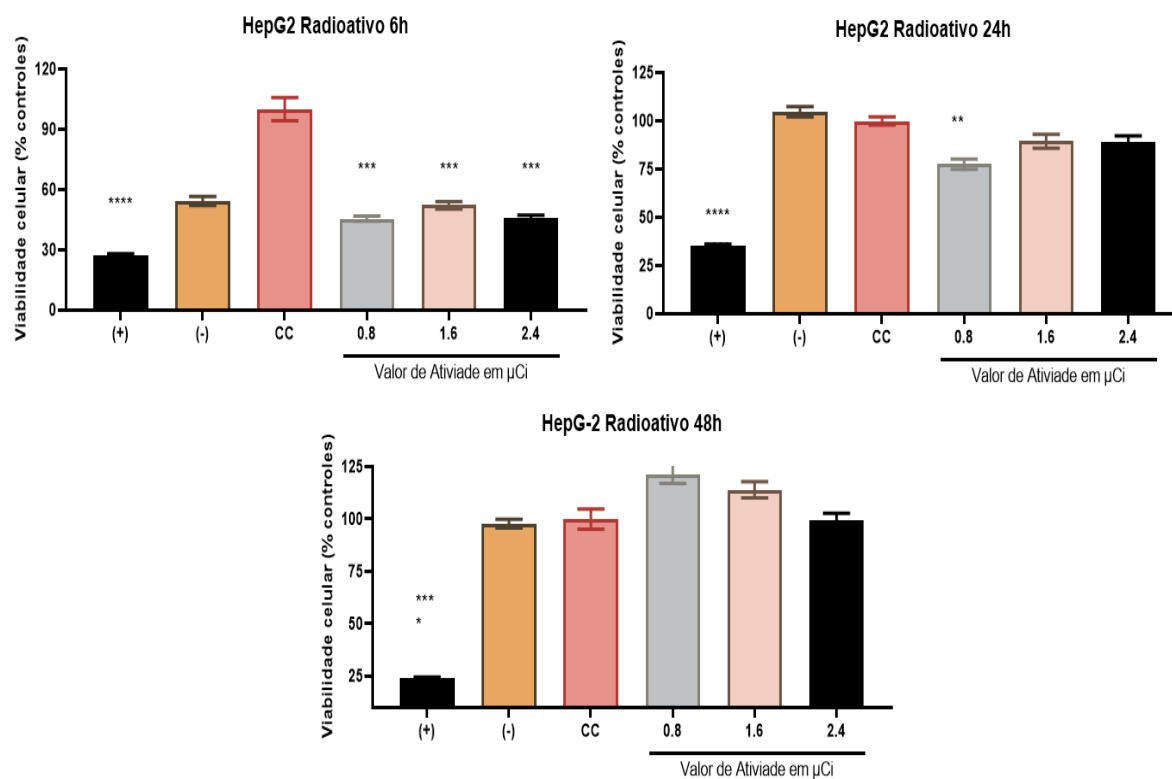
Figura 26 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro radioativas funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linha celular HT29 MTX.



Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 26 apresenta gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células HT29 MTX após exposição a concentrações incrementais de Au-198 (2,5, 5 e 7,5µl) que corresponde as atividades de 0,8, 1,6 e 2.4 µCi. O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que não houve alteração nas diferentes concentrações em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC). O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 41% com 0,8 µCi e apresentou redução significativa a partir dessa concentração a 1,6 µCi. O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 108% a 0,8 µCi, seguido por uma manutenção desse valor até 2,4 µCi. Indicando um crescimento de células entre 24 e 48 horas. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \*P< 0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\*P< 0,0001, elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-198 em células HT29 MTX.

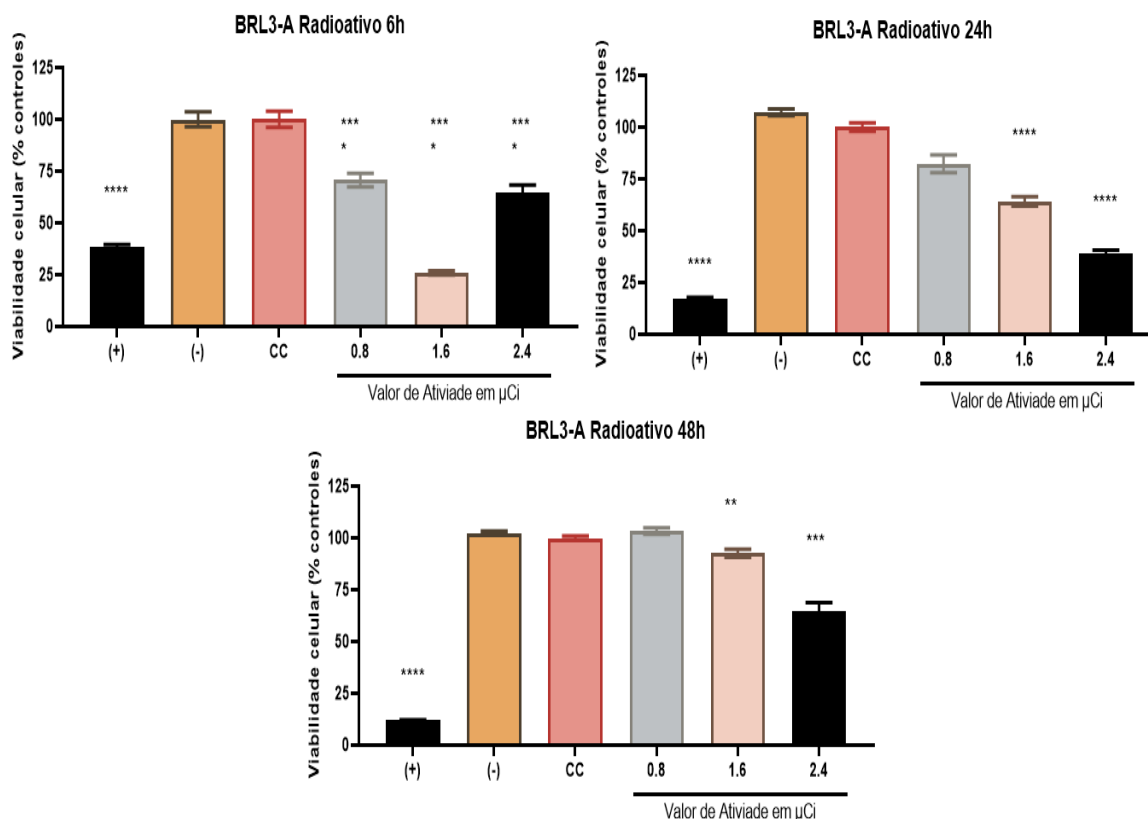
Figura 27 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro radioativas funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linha celular HepG2.



Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 27 apresenta gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células HepG2 após exposição a concentrações incrementais de Au-198 (2,5, 5 e 7,5µl) que corresponde as atividades de 0,8, 1,6 e 2.4 µCi. O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que houve alteração nas diferentes atividades em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC) diminuído de 100% no CC a 45% em 0,8 µCi mantendo-se assim nas demais atividades. O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 77% com 0,8 µCi e apresentou um aumento não significativo a partir dessa atividade. O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 120% a 0,8 µCi, seguido por um aumento não significativo desse valor até 2,4 µCi. Indicando um crescimento de células entre 24 e 48 horas. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-198 em células HepG2.

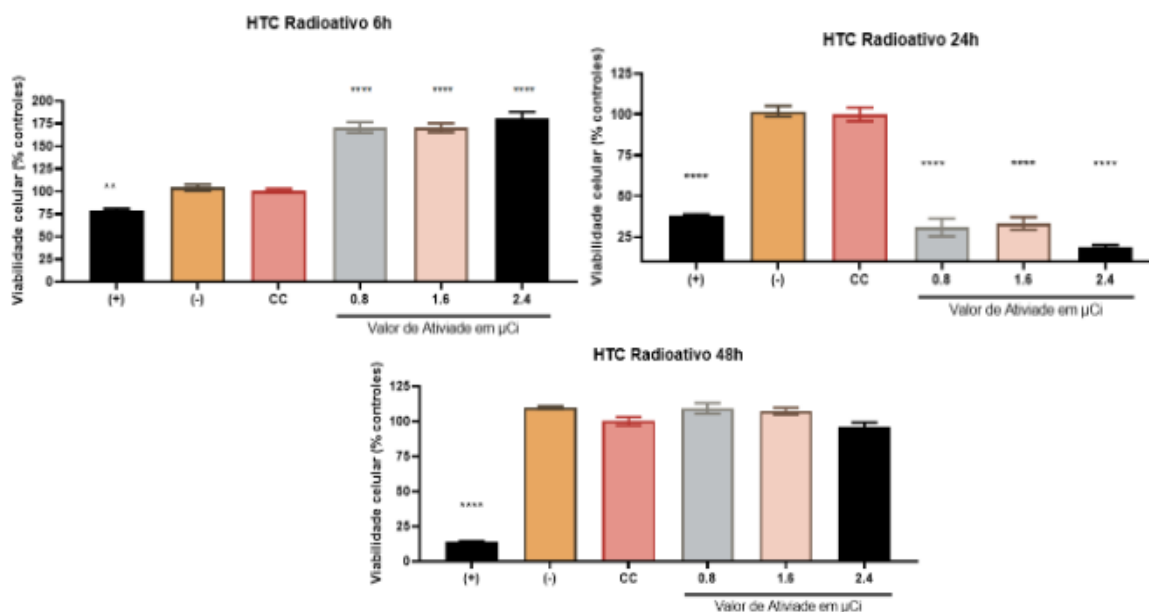
Figura 28 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro radioativo funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linha celular BRL3A.



Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 28 apresenta gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células BRL3A após exposição a concentrações incrementais de Au-198 (2,5, 5 e 7,5 $\mu\text{l}$ ) que corresponde as atividades de 0,8, 1,6 e 2,4  $\mu\text{Ci}$ . O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que houve alteração nas diferentes atividades em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC) diminuído de 100% no CC para 75% em 0,8  $\mu\text{Ci}$ , 25% em 1,6  $\mu\text{Ci}$  e 64% em 2,4  $\mu\text{Ci}$ . O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 88% com 0,8  $\mu\text{Ci}$  continuou diminuindo nas demais atividades. O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 100% a 0,8  $\mu\text{Ci}$ , seguido por uma diminuição desse valor até 64% em 2,4  $\mu\text{Ci}$ . Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-198 em células BRL3A.

Figura 29 - Ensaio de citotoxicidade de nanopartículas de ouro radioativo funcionalizadas com PEG em períodos de tratamento de 6, 24 e 48 horas na linha celular HTC.



Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 29 apresenta gráfico tripartido que ilustra a viabilidade de células BRL3A após exposição a concentrações incrementais de Au-198 (2,5, 5 e 7,5µl) que corresponde as atividades de 0,8, 1,6 e 2.4 µCi. O Gráfico detalha a viabilidade celular em 6 horas pós-tratamento, mostrando que houve alteração nas diferentes atividades em relação a morte celular quando comparada com o controle de células (CC) aumentando de 100% no CC para 170% em 0,8 µCi, e mantendo esse valor até 2,4 µCi. O de 24 horas, onde a viabilidade celular começou em torno de 33% com 0,8 µCi mantendo esse valor nas demais atividades. O Gráfico de 48 horas, com uma viabilidade inicial de 100% a 0,8 µCi, seguido por uma manutenção desse valor sem diferenças significativas. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não tratado (CC) são indicadas como: \*P< 0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, \*\*\*\*P< 0,0001, elucidando um tempo e concentração efeito citotóxico dependente de AuNP-198 em células HTC.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvida uma síntese específica para a produção de nanopartículas de ouro, prevendo a necessidade do trabalho com o material radioativo, e desta forma tentando mitigar o risco de contaminação dos operadores e da área de trabalho.

Foi realizada a avaliação do agente de nucleação e o tamanho das nanopartículas e o método de recobrimento, a fim de mimetizar uma fonte que pudesse ser aplicada em um uso final. Para tanto neste trabalho optou-se por utilizar o PEG com funcionalização de tiol (-SH) e amina (-NH<sub>2</sub>), o que permitirá em trabalhos futuros a adição de agentes de interesse, como biomarcadores ou fármacos.

O MET revelou ainda que as AuNPs-197 produzidas para este trabalho possuem formato esférico, e sugerem boa dispersão na suspensão de AuNPs, sem excesso de agente de recobrimento. A caracterização das AuNPs, radioativas e não radioativas, por DLS revelou que as nanopartículas obtidas possuem um tamanho hidrodinâmico médio de 23 nm, e este tamanho se manteve ao longo do tempo para ambos os tipos de NPs. Além de apresentar um tamanho hidrodinâmico desejável, a estabilidade apresentada das AuNPs, são fatores favoráveis a aplicações biomédicas. Os resultados da distribuição de tamanho dos núcleos das AuNPs-197 obtido pelas imagens de microscopia de transmissão indicaram mais de 80 % das AuNPs-197 possuíam núcleos com diâmetros de 12,12 nm.

O perfil toxicológico das AuNPs-197 PEG se destacou a partir de 24 horas, sem sensibilidade observada em 6 horas, e com efeitos notáveis em concentrações acima de 10%. E para as AuNPs-198 PEG mostrou-se mais eficiente durante as 24 horas, passado esse tempo as células voltaram a se proliferar.

## REFERÊNCIAS

- [1] INCA. ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 13 Mar. 2023.
- [2] ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Ano deve ter 19,3 milhões de novos casos de câncer e 10 milhões de óbitos. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/>>. Acesso em: 2 maio. 2023.
- [3] de Matel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford Gm. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2):e180-e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31862245.
- [4] INCA. Estimativa 2023 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 13 Mar. 2023.
- [5] PARVEEN, Suphiya; SAHOO, Sanjeeb K. Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. *Clinical pharmacokinetics*, v. 45, p. 965-988, 2006.
- [6] PARVEEN, Suphiya; SAHOO, Sanjeeb K. Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *Journal of drug targeting*, v. 16, n. 2, p. 108-123, 2008.
- [7] Liu Cy, Chen Kf, Chen Pj. Treatment of Liver Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015 Jul 17;5(9):a021535. doi: 10.1101/cshperspect.a021535. PMID: 26187874; PMCID: PMC4561392.
- [8] Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li s, Li Hb. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients*. 2016 Mar 10;8(3):156. doi: 10.3390/nu8030156. PMID: 26978396; PMCID: PMC4808884.
- [9] Anwanwan D, Singh Sk, Singh s, Saikam V, Singh r. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020 Jan;1873(1):188314. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188314. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31682895; PMCID: PMC6981221.
- [10] CHENG, Ann-Lii et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The lancet oncology*, v. 10, n. 1, p. 25-34, 2009.
- [11] H. Richly, B. Schultheis, I.a. Adamietz, P. Kupsch, M. Grubert, R.a. Hilger, M. Ludwig, E. Brendel, O. Christensen, D. Strumberg, Combination of sorafenib and doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Results from a phase I extension trial, *European Journal of Cancer*, Volume 45, Issue 4, 2009, Pages 579-587, ISSN 0959-8049, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.039>.
- [12] Greten, T. F., Korangy, F., Manns, M.p., & Malek, N. P. (2009). Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 100(1), 19-23.

- [13] Hodi Fs, Ballinger M, Lyons B, Soria Jc, Nishino M, Tabernero J, Powles T, Smith D, Hoos a, Mckenna C, Beyer u, Rhee I, Fine G, Winslow N, Chen Ds, Wolchok Jd. Immune-Modified Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (imRECIST): Refining Guidelines to Assess the Clinical Benefit of Cancer Immunotherapy. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 20;36(9):850-858. doi: 10.1200/JCO.2017.75.1644. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29341833.
- [14] Misra, Ranjita; Acharya, Sarbari; Sahoo, Sanjeeb K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug discovery today*, v. 15, n. 19-20, p. 842-850, 2010.
- [15] Chanda N, Kan P, Watkinson Ld, Shukla r, Zambre a, Carmack Tl, Engelbrecht H, Lever Jr, Katti K, Fent Gm, Casteel Sw, Smith Cj, Miller Wh, Jurisson s, Boote e, Robertson Jd, Cutler C, Dobrovolskaia M, Kannan r, Katti Kv. Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice. *Nanomedicine*. 2010 Apr;6(2):201-9. doi: 10.1016/j.nano.2009.11.001. Epub 2009 Nov 12. PMID: 19914401.
- [16] Shukla r, Chanda N, Zambre a, Upendran a, Katti K, Kulkarni Rr, Nune Sk, Casteel Sw, Smith Cj, Vimal J, Boote e, Robertson Jd, Kan P, Engelbrecht H, Watkinson Ld, Carmack Tl, Lever Jr, Cutler Cs, Caldwell C, Kannan r, Katti Kv. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):12426-31. doi: 10.1073/pnas.1121174109. Epub 2012 Jul 16. PMID: 22802668; PMCID: PMC3411993.
- [17] Yook s, Cai Z, Lu Y, Winnik Ma, Pignol Jp, Reilly Rm. Intratumorally Injected <sup>177</sup>Lu-Labeled Gold Nanoparticles: Gold Nanoseed Brachytherapy with Application for Neoadjuvant Treatment of Locally Advanced Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2016 Jun;57(6):936-42. doi: 10.2967/jnumed.115.168906. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26848176.
- [18] Aftab s, Shah a, Nadhman a, Kurbanoglu s, Aysil Ozkan s, Dionysiou Dd, Shukla Ss, Aminabhavi Tm. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *International journal of pharmaceutics*. 2018 Apr 5;540(1-2):132-149. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.007. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29427746.
- [19] BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.
- [20] SINGH, Rajendra K.; KNOWLES, Jonathan C.; KIM, Hae-Won. Advances in nanoparticle development for improved therapeutics delivery: nanoscale topographical aspect. *Journal of tissue engineering*, v. 10, p. 2041731419877528, 2019.
- [21] MOGHIMI, Seyed Moien; HUNTER, A. C.; ANDRESEN, T. L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 52, p. 481-503, 2012.
- [22] NIE, Shuming. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*, v. 5, n. 4, p. 523-528, 2010.

- [23] VEISEH, Omid; GUNN, Jonathan W.; ZHANG, Miqin. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*, v. 62, n. 3, p. 284-304, 2010.
- [24] SCHINONI, M. A. *Fisiologia Hepática*, Gazméd, p. 5-9. 2006.
- [25] Si-Tayeb, Karim, Frédéric P. Lemaigre, and Stephen A. Duncan. "Organogenesis and development of the liver." *Developmental cell* 18.2 (2010): 175-189
- [26] Schulick RD. 2006. Hepatobiliary and portal venous system. In: MW Mulholland, KD Lillemoe, editors. *Greenfield's Surgery: Scientific Principles and Practice*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 893–909.
- [27] Burt AD and Day CP. MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, and Anthony PP. Pathophysiology of the liver. *Pathology of the Liver* 2002 New York Churchill Livingstone 67-105
- [28] Haywood S. The non-random distribution of copper within the liver of rats. *Br J Nutr*. 1981 Mar;45(2):295-300. doi: 10.1079/bjn19810106. PMID: 7213583.
- [29] Faa G, Liguori C, Columbano A, Diaz G. Uneven copper distribution in the human newborn liver. *Hepatology*. 1987 Sep-Oct;7(5):838-42. doi: 10.1002/hep.1840070508. PMID: 2443435.
- [30] Faa G, Sciò R, Farci AM, Callea F, Ambu R, Congiu T, van Eyken P, Cappai G, Marras A, Costa V, et al. Iron concentration and distribution in the newborn liver. *Liver*. 1994 Aug;14(4):193-9. doi: 10.1111/j.1600-0676.1994.tb00073.x. PMID: 7968279.
- [31] Faa G, Nurchi V, Demelia L, Ambu R, Parodo G, Congiu T, Sciò R, Van Eyken P, Silvagni R, Crisponi G. Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease. *J Hepatol*. 1995 Mar;22(3):303-8. doi: 10.1016/0168-8278(95)80283-5. PMID: 7608481.
- [32] Thein E, Becker M, Anetzberger H, Hammer C, Messmer K. Direct assessment and distribution of regional portal blood flow in the pig by means of fluorescent microspheres. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Nov;95(5):1808-16. doi: 10.1152/jappphysiol.00362.2003. Epub 2003 Jun 20. PMID: 12819221.
- [33] Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol*. 2005;33(1):27-34. doi: 10.1080/01926230590881826. PMID: 15805053.
- [34] Bloom W and Fawcett DW. Bloom W and Fawcett DW. Liver and gall bladder. *A textbook of histology* 1975 Philadelphia W. B. Saunders 688-718.
- [35] Jones AL and Spring-Mills E. Weiss L. The liver and gallbladder. *Histology* 1983 New York Elsevier Biomedical 707-735
- [36] Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2001;161:III-XIII, 1-151. doi: 10.1007/978-3-642-56553-3. PMID: 11729749.

- [37] Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol*. 2002 Dec;13(6):425-31. doi: 10.1016/s1084952102001301. PMID: 12468243.
- [38] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2008. Specialized tissues, stem cells, and tissue renewal. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group, pp. 1442–1444.
- [39] Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol*. 2002 Aug 23;1(1):1. doi: 10.1186/1476-5926-1-1. PMID: 12437787; PMCID: PMC131011.
- [40] Smedsrød B. Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol*. 2004 Jan 14;3 Suppl 1(Suppl 1):S22. doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S22. PMID: 14960174; PMCID: PMC2409441.
- [41] Jones AL and Spring-Mills E. Weiss L. The liver and gallbladder. *Histology* 1983 New York Elsevier Biomedical 707-735
- [42] MacSween RNM, Desmet VJ, Roskams T, and Scothorne RJ. MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, and Anthony PP. Developmental anatomy and normal structure. *Pathology of the Liver* 2002 New York Churchill Livingstone 1-66
- [43] Bykov I, Ylipaasto P, Eerola L, Lindros KO. Functional Differences between Periportal and Perivenous Kupffer Cells Isolated by Digitonin-Collagenase Perfusion. *Comp Hepatol*. 2004 Jan 14;3 Suppl 1(Suppl 1):S34. doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S34. PMID: 14960186; PMCID: PMC2410253.
- [44] Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech*. 1997 Nov 15;39(4):350-64. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19971115)39:4<350::AID-JEMT5>3.0.CO;2-L. PMID: 9407545.
- [45] Ratziu V and Friedman SL. Vidal-Vanaclocha F. Pathobiology of hepatic stellate cells. *Functional Heterogeneity of Liver Tissue: From Cell Lineage Diversity to Sublobular Compartment-Specific Pathogenesis* 1997 Austin R. G. Landes Company 133-160
- [46] Fehrenbach H, Weiskirchen R, Kasper M, Gressner AM. Up-regulated expression of the receptor for advanced glycation end products in cultured rat hepatic stellate cells during transdifferentiation to myofibroblasts. *Hepatology*. 2001 Nov;34(5):943-52. doi: 10.1053/jhep.2001.28788. PMID: 11679965.
- [47] Albanis E, Safadi R, Friedman SL. Treatment of hepatic fibrosis: almost there. *Curr Gastroenterol Rep*. 2003 Feb;5(1):48-56. doi: 10.1007/s11894-003-0009-7. PMID: 12530948.
- [48] Kawada N. Molecular mechanism of stellate cell activation and therapeutic strategy for liver fibrosis. *Comp Hepatol*. 2004 Jan 14;3 Suppl 1(Suppl 1):S3. doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S3. PMID: 14960155; PMCID: PMC2410226.

- [49] Mabuchi A, Mullaney I, Sheard P, Hessian P, Zimmermann A, Senoo H, Wheatley AM. Role of Hepatic Stellate Cells in the Early Phase of Liver Regeneration in Rat: Formation of Tight Adhesion to Parenchymal Cells. *Comp Hepatol*. 2004 Jan 14;3 Suppl 1(Suppl 1):S29. doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S29. PMID: 14960181; PMCID: PMC2410248.
- [50] Tietz PS, Larusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006 May;22(3):279-87. doi: 10.1097/01.mog.0000218965.78558.bc. PMID: 16550043.
- [51] Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clin Anat*. 2014 Jul;27(5):764-9. doi: 10.1002/ca.22350. Epub 2014 Jan 22. PMID: 24453062.
- [52] ICRP, 2012 ICRP Statement on Tissue Reactions / Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs – Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context. ICRP Publication 118. *Ann. ICRP* 41(1/2).
- [53] Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constone LS, Eisbruch A, Bentzen SM, Nam J, Deasy JO. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Mar 1;76(3 Suppl):S10-9. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.07.1754. PMID: 20171502; PMCID: PMC4041542.
- [54] Pan CC, Kavanagh BD, Dawson LA, Li XA, Das SK, Miften M, Ten Haken RK. Radiation-associated liver injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Mar 1;76(3 Suppl):S94-100. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.06.092. PMID: 20171524; PMCID: PMC4388033.
- [55] Dawson LA, Ten Haken RK. Partial volume tolerance of the liver to radiation. *Semin Radiat Oncol*. 2005 Oct;15(4):279-83. doi: 10.1016/j.semradonc.2005.04.005. PMID: 16183482.
- [56] Tefft M, Mitus A, Das L, Vawter GF, Filler RM. Irradiation of the liver in children: review of experience in the acute and chronic phases, and in the intact normal and partially resected. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1970 Feb;108(2):365-85. doi: 10.2214/ajr.108.2.365. PMID: 4312896.
- [57] Gilbertson RJ. Mapping cancer origins. *Cell*. 2011 Apr 1;145(1):25-9. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.019. PMID: 21458665; PMCID: PMC3077217.
- [58] Ferlay , M Ervik , F Lam , et al, eds. *Observatório Global do Câncer: Câncer Hoje* . Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer; 2020 . Acessado em 20 de novembro de 2023. [gco.iarc.fr/today](http://gco.iarc.fr/today)
- [59] Valencia DN. Brief review on COVID-19: the 2020 pandemic caused by SARS-CoV-2. *Cureus*. 2020; 12:e7386.; World Health Organization (WHO). *Coronavirus disease (COVID-19) pandemic*. WHO; 2020. Acessado em 20 de novembro de 2023. [who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019](http://who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019)
- [60] AMERICAN CANCER SOCIETY. *Global Cancer Facts & Figures*. Atlanta. 2015.
- [61] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality*

Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

[62] Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2005;25(2):181-200. doi: 10.1055/s-2005-871198. PMID: 15918147.

[63] Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J. Long-term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function: implications for a strategy of salvage transplantation. *Ann Surg.* 2002 Mar;235(3):373-82. doi: 10.1097/0000658-200203000-00009. PMID: 11882759; PMCID: PMC1422443.

[64] Altekruse SF, McGlynn KA, Dickie LA, Kleiner DE. Hepatocellular carcinoma confirmation, treatment, and survival in surveillance, epidemiology, and end results registries, 1992-2008. *Hepatology.* 2012 Feb;55(2):476-82. doi: 10.1002/hep.24710. PMID: 21953588; PMCID: PMC3868012.

[65] Fong ZV, Tanabe KK. The clinical management of hepatocellular carcinoma in the United States, Europe, and Asia: a comprehensive and evidence-based comparison and review. *Cancer.* 2014 Sep 15;120(18):2824-38. doi: 10.1002/cncr.28730. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24897995.

[66] Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 2006 Sep;6(9):674-87. doi: 10.1038/nrc1934. PMID: 16929323.

[67] Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer.* 1985 Aug 15;56(4):918-28. doi: 10.1002/1097-0142(19850815)56:4<918::aid-cncr2820560437>3.0.co;2-e. PMID: 2990661.

[68] Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. *J Hepatol.* 1999 Jul;31(1):133-41. doi: 10.1016/s0168-8278(99)80173-1. PMID: 10424293.

[69] Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):329-38. doi: 10.1055/s-2007-1007122. PMID: 10518312.

[70] Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol.* 2003;38(3):207-15. doi: 10.1007/s005350300038. PMID: 12673442.

[71] Kudo M, Chung H, Haji S, Osaki Y, Oka H, Seki T, Kasugai H, Sasaki Y, Matsunaga T. Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: the JIS score compared with the CLIP score. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1396-405. doi: 10.1002/hep.20486. PMID: 15565571.

- [72] Pons F, Varela M, Llovet JM. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB* (Oxford). 2005;7(1):35-41. doi: 10.1080/13651820410024058. PMID: 18333159; PMCID: PMC2023920.
- [73] Ikai I, Takayasu K, Omata M, Okita K, Nakanuma Y, Matsuyama Y, Makuuchi M, Kojiro M, Ichida T, Arii S, Yamaoka Y; Liver Cancer Study Group of Japan. A modified Japan Integrated Stage score for prognostic assessment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2006 Sep;41(9):884-92. doi: 10.1007/s00535-006-1878-y. PMID: 17048053.
- [74] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. 2010. *Manual de estadiamento do câncer AJCC*, 7ª ed. (ed. Edge SB, et al.), p. 175 Springer, Nova York
- [75] Vauthey JN, Ribero D, Abdalla EK, Jonas S, Bharat A, Schumacher G, Lerut J, Chapman WC, Hemming AW, Neuhaus P. Outcomes of liver transplantation in 490 patients with hepatocellular carcinoma: validation of a uniform staging after surgical treatment. *J Am Coll Surg*. 2007 May;204(5):1016-27; discussion 1027-8. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2006.12.043. PMID: 17481532.
- [76] Lu W, Dong J, Huang Z, Guo D, Liu Y, Shi S. Comparison of four current staging systems for Chinese patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative resection: Okuda, CLIP, TNM and CUPI. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec;23(12):1874-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05527.x. PMID: 18752560.
- [77] CLIP 2000. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology*. 2000 Apr;31(4):840-5. doi: 10.1053/he.2000.5628. PMID: 10733537.
- [78] Ueno S, Tanabe G, Sako K, Hiwaki T, Hokotate H, Fukukura Y, Baba Y, Imamura Y, Aikou T. Discrimination value of the new western prognostic system (CLIP score) for hepatocellular carcinoma in 662 Japanese patients. *Cancer of the Liver Italian Program. Hepatology*. 2001 Sep;34(3):529-34. doi: 10.1053/jhep.2001.27219. PMID: 11526539.
- [79] Huitzil-Melendez FD, Capanu M, O'Reilly EM, Duffy A, Gansukh B, Saltz LL, Abou-Alfa GK. Advanced hepatocellular carcinoma: which staging systems best predict prognosis? *J Clin Oncol*. 2010 Jun 10;28(17):2889-95. doi: 10.1200/JCO.2009.25.9895. Epub 2010 May 10. PMID: 20458042; PMCID: PMC3651603.
- [80] Cho YK, Chung JW, Kim JK, Ahn YS, Kim MY, Park YO, Kim WT, Byun JH. Comparison of 7 staging systems for patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Cancer*. 2008 Jan 15;112(2):352-61. doi: 10.1002/cncr.23185. PMID: 18008352.
- [81] Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology*. 2005 Apr;41(4):707-16. doi: 10.1002/hep.20636. PMID: 15795889.
- [82] Guglielmi A, Ruzzenente A, Pachera S, Valdegamberi A, Sandri M, D'Onofrio M, Iacono C. Comparison of seven staging systems in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma in a cohort of patients who underwent radiofrequency ablation with complete response. *Am J Gastroenterol*. 2008 Mar;103(3):597-604. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01604.x. Epub 2007 Oct 26. PMID: 17970836.

[83] Cillo U, Vitale A, Grigoletto F, Farinati F, Brolese A, Zanusi G, Neri D, Boccagni P, Srsen N, D'Amico F, Ciarleglio FA, Bridda A, D'Amico DF. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *J Hepatol.* 2006 Apr;44(4):723-31. doi: 10.1016/j.jhep.2005.12.015. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16488051.

[84] Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008 Jun;134(7):1908-16. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.091. Epub 2008 Mar 8. PMID: 18549877.

[85] Torzilli G, Donadon M, Marconi M, Palmisano A, Del Fabbro D, Spinelli A, Botea F, Montorsi M. Hepatectomy for stage B and stage C hepatocellular carcinoma in the Barcelona Clinic Liver Cancer classification: results of a prospective analysis. *Arch Surg.* 2008 Nov;143(11):1082-90. doi: 10.1001/archsurg.143.11.1082. PMID: 19015467.

[86] Vitale A, Morales RR, Zanusi G, Farinati F, Burra P, Angeli P, Frigo AC, Del Poggio P, Rapaccini G, Di Nolfo MA, Benvegnù L, Zoli M, Borzio F, Giannini EG, Caturelli E, Chiaramonte M, Trevisani F, Cillo U; Italian Liver Cancer group. Barcelona Clinic Liver Cancer staging and transplant survival benefit for patients with hepatocellular carcinoma: a multicentre, cohort study. *Lancet Oncol.* 2011 Jul;12(7):654-62. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70144-9. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21684210.

[87] Cheung TT, Poon RT, Yuen WK, Chok KS, Jenkins CR, Chan SC, Fan ST, Lo CM. Long-term survival analysis of pure laparoscopic versus open hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a single-center experience. *Ann Surg.* 2013 Mar;257(3):506-11. doi: 10.1097/SLA.0b013e31827b947a. PMID: 23299521.

[88] Kamiyama T, Tahara M, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Matsushita M, Todo S. Long-term outcome of laparoscopic hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2014 Mar-Apr;61(130):405-9. PMID: 24901150.

[89] Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology.* 2001 Jun;33(6):1394-403. doi: 10.1053/jhep.2001.24563. PMID: 11391528.

[90] Duffy JP, Vardanian A, Benjamin E, Watson M, Farmer DG, Ghobrial RM, Lipshutz G, Yersiz H, Lu DS, Lassman C, Tong MJ, Hiatt JR, Busuttil RW. Liver transplantation criteria for hepatocellular carcinoma should be expanded: a 22-year experience with 467 patients at UCLA. *Ann Surg.* 2007 Sep;246(3):502-9; discussion 509-11. doi: 10.1097/SLA.0b013e318148c704. PMID: 17717454; PMCID: PMC1959350.

[91] Takayasu K, Arai S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y; Liver Cancer Study Group of Japan. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology.* 2006 Aug;131(2):461-9. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.021. PMID: 16890600.

- [92] Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J; Barcelona Liver Cancer Group. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 May 18;359(9319):1734-9. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08649-X. PMID: 12049862.
- [93] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. 2006 Dec 15;66(24):11851-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377. PMID: 17178882.
- [94] Burroughs A, Hochhauser D, Meyer T. Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum. *Lancet Oncol*. 2004 Jul;5(7):409-18. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01508-6. PMID: 15231247.
- [95] Liu CY, Chen KF, Chen PJ. Treatment of Liver Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Jul 17;5(9):a021535. doi: 10.1101/cshperspect.a021535. PMID: 26187874; PMCID: PMC4561392.
- [96] Martelletti, LBS de J., Vasconcelos, SCCM e, Bontempo, P de SM, Simino, GPR, Ferreira, EB, Reis, PED dos. Avaliação da adesão ao autocuidado em mulheres submetidas à braquiterapia ginecológica. *Rev. enferm. Cent.-Oeste Min*. 2020; 10(1). Disponível em: <http://doi.org/10.19175/recom.v10i0.3883>.
- [97] Sangro B, Iñarrairaegui M, Bilbao JJ. Radioembolization for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012 Feb;56(2):464-73. doi: 10.1016/j.jhep.2011.07.012. Epub 2011 Aug 2. PMID: 21816126.
- [98] Trifanescu OG, Gales LN, Serbanescu GL, Zgura AF, Iliescu L, Mehedintu C, Anghel RM. Long-term oncological outcome in patients with cervical cancer after 3 trimodality treatment (radiotherapy, platinum-based chemotherapy, and robotic surgery). *Medicine (Baltimore)*. 2021 Apr 2;100(13):e25271. doi: 10.1097/MD.00000000000025271. PMID: 33787611; PMCID: PMC8021375.
- [99] Suneja G, Brown D, Chang A, Erickson B, Fidarova E, Grover S, Mahantshetty U, Nag S, Narayan K, Bvochora-Nsingo M, Viegas C, Viswanathan AN, Lin MY, Gaffney D. American Brachytherapy Society: Brachytherapy treatment recommendations for locally advanced cervix cancer for low-income and middle-income countries. *Brachytherapy*. 2017 Jan-Feb;16(1):85-94. doi: 10.1016/j.brachy.2016.10.007. Epub 2016 Dec 3. PMID: 27919654.
- [100] National Nanotechnology Initiative (NNI) [(acesso em 11 de novembro de 2023)];Disponível online: [www.nano.gov](http://www.nano.gov) .
- [101] BROWN, A.; HONDOW, N. *Frontiers of Nanoscience*. [S.l.]: Elsevier, v. 5, 2013. 95-120 p
- [102] CALLISTER JR., W. D. *Materials Science and Engineering: An Introduction*. 7a. ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.

[103] ROEBBEN, G.; RAUSCHER, H. Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term “nanomaterial”, Part 2: Assessment of collected information concerning the experience with the definition. JRC Scientific and Policy Reports. Luxembourg. 2014.

[104] iubin Xu, Shaoyu Lü, Chunmei Gao, Xinggang Wang, Xiao Bai, Haogang Duan, Nannan Gao, Chen Feng, Mingzhu Liu, Polymeric micelle-coated mesoporous silica nanoparticle for enhanced fluorescent imaging and pH-responsive drug delivery, *Chemical Engineering Journal*, Volume 279, 2015, Pages 851-860, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.085>.

[105] Bakshi MS, Zhao L, Smith R, Possmayer F, Petersen NO. Metal nanoparticle pollutants interfere with pulmonary surfactant function in vitro. *Biophys J*. 2008 Feb 1;94(3):855-68. doi: 10.1529/biophysj.107.106971. Epub 2007 Sep 21. PMID: 17890383; PMCID: PMC2186259.

[106] Francesca Porta, Giovanna Speranza, Željka Krpetić, Vladimiro Dal Santo, Pierangelo Francescato, Giorgio Scari, Gold nanoparticles capped by peptides, *Materials Science and Engineering: B*, Volume 140, Issue 3, 2007, Pages 187-194, ISSN 0921-5107, <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2007.03.019>.

[107] Kiessling F, Mertens ME, Grimm J, Lammers T. Nanoparticles for imaging: top or flop? *Radiology*. 2014 Oct;273(1):10-28. doi: 10.1148/radiol.14131520. Erratum in: *Radiology*. 2015 Jan;274(1):307. PMID: 25247562; PMCID: PMC4186876.

[108] Rizzo LY, Theek B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2013 Dec;24(6):1159-66. doi: 10.1016/j.copbio.2013.02.020. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23578464; PMCID: PMC3833836.

[109] Lammers T, Aime S, Hennink WE, Storm G, Kiessling F. Theranostic nanomedicine. *Acc Chem Res*. 2011 Oct 18;44(10):1029-38. doi: 10.1021/ar200019c. Epub 2011 May 5. PMID: 21545096.

[110] Theek B, Rizzo LY, Ehling J, Kiessling F, Lammers T. The Theranostic Path to Personalized Nanomedicine. *Clin Transl Imaging*. 2014 Feb 1;2(1):66-76. doi: 10.1007/s40336-014-0051-5. PMID: 24860796; PMCID: PMC4031631.

[111] Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine (Lond)*. 2008 Apr;3(2):137-40. doi: 10.2217/17435889.3.2.137. PMID: 18373419.

[112] Baetke SC, Lammers T, Kiessling F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br J Radiol*. 2015 Oct;88(1054):20150207. doi: 10.1259/bjr.20150207. Epub 2015 Jun 12. PMID: 25969868; PMCID: PMC4630860.

[113] Kunjachan S, Jayapaul J, Mertens ME, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Theranostic systems and strategies for monitoring nanomedicine-mediated drug targeting. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Mar;13(4):609-22. doi: 10.2174/138920112799436302. PMID: 22214503.

- [114] Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Jan;65(1):36-48. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23036225.
- [115] Chanda N, Kan P, Watkinson LD, Shukla R, Zambre A, Carmack TL, Engelbrecht H, Lever JR, Katti K, Fent GM, Casteel SW, Smith CJ, Miller WH, Jurisson S, Boote E, Robertson JD, Cutler C, Dobrovolskaia M, Kannan R, Katti KV. Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice. *Nanomedicine.* 2010 Apr;6(2):201-9. doi: 10.1016/j.nano.2009.11.001. Epub 2009 Nov 12. PMID: 19914401.
- [116] Shukla R, Chanda N, Zambre A, Upendran A, Katti K, Kulkarni RR, Nune SK, Casteel SW, Smith CJ, Vimal J, Boote E, Robertson JD, Kan P, Engelbrecht H, Watkinson LD, Carmack TL, Lever JR, Cutler CS, Caldwell C, Kannan R, Katti KV. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 31;109(31):12426-31. doi: 10.1073/pnas.1121174109. Epub 2012 Jul 16. PMID: 22802668; PMCID: PMC3411993.
- [117] Alam F, Naim M, Aziz M, Yadav N. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. *Indian J Cancer.* 2015 Jan-Mar;52(1):1-9. doi: 10.4103/0019-509X.175591. PMID: 26837958.
- [118] Yook S, Cai Z, Lu Y, Winnik MA, Pignol JP, Reilly RM. Intratumorally Injected 177Lu-Labeled Gold Nanoparticles: Gold Nanoseed Brachytherapy with Application for Neoadjuvant Treatment of Locally Advanced Breast Cancer. *J Nucl Med.* 2016 Jun;57(6):936-42. doi: 10.2967/jnumed.115.168906. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26848176.
- [119] JAIN; JOSHI, S. Nanomedicine : A Promising Tool for the Treatment of Cancer. *Pharmacologyonline*, n. 3, 2009. 574-590.
- [120] Saha M. Nanomedicine: promising tiny machine for the healthcare in future-a review. *Oman Med J.* 2009 Oct;24(4):242-7. doi: 10.5001/omj.2009.50. PMID: 22216376; PMCID: PMC3243873.
- [121] Yeh YC, Creran B, Rotello VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale.* 2012 Mar 21;4(6):1871-80. doi: 10.1039/c1nr11188d. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22076024; PMCID: PMC4101904.
- [122] Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012 Apr 7;41(7):2740-79. doi: 10.1039/c1cs15237h. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22109657; PMCID: PMC5876014.
- [123] Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae.* 2011 Apr;3(2):34-55. PMID: 22649683; PMCID: PMC3347577.
- [124] Mie, G. Contributions to the Optics of Turbid Media, Particularly of Colloidal Metal Solutions . *Ann. Phys.* 1908 , 330 ( 3 ), 377 - 445 , DOI: 10.1002 / andp.19083300302

- [125] Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 1971 Nov;8(11):1081-3. doi: 10.1016/0019-2791(71)90496-4. PMID: 4110101.
- [126] Zhang N, Xiong G, Liu Z. Toxicity of metal-based nanoparticles: Challenges in the nano era. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Nov 10;10:1001572. doi: 10.3389/fbioe.2022.1001572. PMID: 36619393; PMCID: PMC9822575.
- [127] Alam F, Naim M, Aziz M, Yadav N. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. *Indian J Cancer*. 2015 Jan-Mar;52(1):1-9. doi: 10.4103/0019-509X.175591. PMID: 26837958.
- [128] SOUZA, C. D. D.; NOGUEIRA, B. R.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles, n. 798, p. 714- 740, 2019.
- [129] Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B*. 2006 Aug 17;110(32):15700-7. doi: 10.1021/jp061667w. PMID: 16898714.
- [130] Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*. 2005 Nov 1;10(21):1451-8. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03575-0. PMID: 16243265.
- [131] Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2011 Jun;6(4):715-28. doi: 10.2217/nnm.11.19. PMID: 21718180; PMCID: PMC3217316.
- [132] Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, Davis FF. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem*. 1977 Jun 10;252(11):3582-6. PMID: 16907.
- [133] Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine*. 2014 Sep 15;9:4357-73. doi: 10.2147/IJN.S46900. PMID: 25258527; PMCID: PMC4172146.
- [134] Castells, M. C.; Phillips, E. J. Maintaining Safety with SARS-CoV-2 Vaccines. *N. Engl. J. Med*. 2021, 384, 643– 649, DOI: 10.1056/NEJMra2035343.
- [135] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett*. 1990 Jul 30;268(1):235-7. doi: 10.1016/0014-5793(90)81016-h. PMID: 2384160.
- [136] Ahmed M, Lukyanov AN, Torchilin V, Tournier H, Schneider AN, Goldberg SN. Combined radiofrequency ablation and adjuvant liposomal chemotherapy: effect of chemotherapeutic agent, nanoparticle size, and circulation time. *J Vasc Interv Radiol*. 2005 Oct;16(10):1365-71. doi: 10.1097/01.RVI.0000175324.63304.25. PMID: 16221908.
- [137] Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 1;11(19 Pt 1):6944-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0343. PMID: 16203786.

- [138] van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm Res.* 2007 Aug;24(8):1405-14. doi: 10.1007/s11095-007-9284-6. Epub 2007 Mar 29. PMID: 17393074.
- [139] Yang P, Ando M, Murase N. Various Au nanoparticle organizations fabricated through SiO<sub>2</sub> monomer induced self-assembly. *Langmuir.* 2011 Feb 1;27(3):895-901. doi: 10.1021/la103143j. Epub 2010 Dec 28. PMID: 21188967.
- [140] Zhao W, Brook MA, Li Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *Chembiochem.* 2008 Oct 13;9(15):2363-71. doi: 10.1002/cbic.200800282. PMID: 18821551.
- [141] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008 Jul-Aug;5(4):505-15. doi: 10.1021/mp800051m. Epub 2008 Aug 4. PMID: 18672949; PMCID: PMC2663893.
- [142] Seniwai B, Thiye VC, Singh S, Fonseca TCF, Freitas de Freitas L. Recent Advances in Brachytherapy Using Radioactive Nanoparticles: An Alternative to Seed-Based Brachytherapy. *Front Oncol.* 2021 Nov 24;11:766407. doi: 10.3389/fonc.2021.766407.
- [143] Dickhoff LR, Vrancken Peeters MJ, Bosman PA, Alderliesten T. Therapeutic applications of radioactive sources: from image-guided brachytherapy to radio-guided surgical resection. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2021 Sep;65(3):190-201. doi: 10.23736/S1824-4785.21.03370-7
- [144] Laprise-Pelletier M, Lagueux J, Côté MF, LaGrange T, Fortin MA. Low-Dose Prostate Cancer Brachytherapy with Radioactive Palladium-Gold Nanoparticles. *Adv Healthc Mater.* 2017 Feb;6(4). doi: 10.1002/adhm.201601120.
- [145] Muhammad Arif, Ayesha Fazal Nawaz, Shahid Ullah khan, Hasnat Mueen, Fizza Rashid, Hassan A. Hemeg, Abdur Rauf. Nanotechnology-based radiation therapy to cure cancer and the challenges in its clinical applications, *Heliyon*, Volume 9, Issue 6, 2023. doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17252.
- [146] D. Kwatra, A. Venugopal, S. Anant. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl. Cancer Res.*, 2 (4) (2013), pp. 330-342, 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06
- [147] Muhammad Arif, Ayesha Fazal Nawaz, Shahid Ullah khan, Hasnat Mueen, Fizza Rashid, Hassan A. Hemeg, Abdur Rauf. Nanotechnology-based radiation therapy to cure cancer and the challenges in its clinical applications, *Heliyon*, Volume 9, Issue 6, 2023. doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17252.
- [148] J. Webster, *Safety of Nanoparticles: from Manufacturing to Medical Applications*, Springer Science & Business Media, New York, 2009, pp. 209–235.
- [149] B. Ankamwar, Size and shape effect on biomedical applications of nanomaterials, *Biomed. Eng. Techn. App. Med.* (2012) 93–114, <https://doi.org/10.5772/46121>.
- [150] L. Štefančíková, E. Porcel, P. Eustache, S. Li, D. Salado, S. Marco, S. Lacombe, Cell localization of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitizing efficacy

in glioblastoma cells, *Canc. Nanotech.* 5 (1) (2014), <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0006-6>.

[151] J. Ma, R. Xu, J. Sun, D. Zhao, J. Tong, X. Sun, Nanoparticle surface and Nanocore properties determine the effect on Radiosensitivity of cancer cells upon ionizing radiation treatment, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13 (2) (2013) 1472–1475, <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.6087>.

[152] E. Porcel, S. Liehn, H. Remita, N. Usami, K. Kobayashi, Y. Furusawa, S. Lacombe, Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology* 21 (8) (2010) 85103–85110, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/8/085103>.

[153] H.E. Townley, J. Kim, P.J. Dobson, In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped Titania nanoparticles, *Nanoscale* 4 (16) (2012) 5043–5050. [doi.org/10.1039/c2nr30769c](https://doi.org/10.1039/c2nr30769c).

[154] J. A. Kemp, Y. J. Kwon. Cancer nanotechnology: current status and perspectives, *Nano Converg.* 8(1) (2021)1–38. [doi.org/10.1186/s40580-021-00282-7](https://doi.org/10.1186/s40580-021-00282-7).

[155] D.Ali, S.Alarifi, S.Aлкаhtani, A.A.Aлкаhtane, A.Almalik. Cerium oxide nanoparticles induce oxidative stress and Genotoxicity in human skin melanoma cells, *Cell Biochem. Biophys.* 71 (3) (2014) 1643–1651. [doi.org/10.1007/s12013-014-0386-6](https://doi.org/10.1007/s12013-014-0386-6).

[156] R.R. Pillai, P.B. Sreelekshmi, A.P. Meera, S. Thomas, Biosynthesized iron oxide nanoparticles: cytotoxic evaluation against human colorectal cancer cell lines, *Mater. Today: Proc.* 50 (2022) 187–195. [doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.151](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.151).

[157] R. Brown, M. Tehei, S. Oktaria, A. Briggs, C. Stewart, K. Konstantinov, M. Lerch, High-Z Nanostructured ceramics in radiotherapy: first evidence of Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>- induced dose enhancement on radioresistant cancer cells in an MV photon Field, *Part. Part. Syst. Char.* 31 (4) (2013) 500–505. [doi.org/10.1002/ppsc.201300276](https://doi.org/10.1002/ppsc.201300276).

[158] D.Kwatra, A.Venugopal, S.Anant. Nanoparticles in radiationtherapy: a summary of various approaches to enhance radio sensitization in cancer. *Transl.Cancer Res.* 2 (4) (2013) 330–342. [doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06](https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06).

[159] L. Gong, Y. Zhang, C. Liu, M. Zhang, S. Han, Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy, *Int. J. Nanomed.* 16 (2021) 1083–1102. [doi.org/10.2147/IJN.S290438](https://doi.org/10.2147/IJN.S290438).

[160] D.Kwatra, A.Venugopal, S.Anant. Nanoparticles in radiationtherapy: a summary of various approaches to enhance radio sensitization in cancer. *Transl.Cancer Res.* 2 (4) (2013) 330–342. [doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06](https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06).

[161] Q. Zhang, W. Yang, N. Man, F. Zheng, Y. Shen, K. Sun, L. Wen. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C<sub>60</sub> nanocrystal. *Autophagy* 5 (8) (2009) 1107–1117. [doi.org/10.4161/auto.5.8.9842](https://doi.org/10.4161/auto.5.8.9842).

[162] J.U. Menon, V. Tumati, J. Hsieh, K.T. Nguyen, D. Saha. Polymeric nanoparticles for targeted radiosensitization of prostate cancer cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 103 (5) (2014) 1632–1639. [doi.org/10.1002/jbm.a.35300](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35300).

- [163] TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.; HILLIER, J. A Study of the Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society*, v. 11, p. 55, 1951.
- [164] JI, Xiaohui et al. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 45, p. 13939-13948, 2007.
- [165] ZAMBONI, C. B. *Fundamentos da física de nêutrons*. São Paulo: Livraria da Física, 2007.
- [166] LENG, W.; PATI, P.; VIKESLAND, J. Room temperature seed mediated growth of gold nanoparticles: mechanistic investigations and life cycle assesment. *Environmental Science: Nano*, v. 2, p. 440-453, 2015.
- [167] Frank Herbert Attix. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. John Wiley & Sons, INC., 1986.
- [168] KNOLL, G. F. *Radiation Detection and Measurement*. 3a. ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.
- [169] ZADDACH, G. *Katalog von Ge (Li)- $\gamma$ -Spektren: Band 2. Kernforschungsanlage Jülich*. Jülich, p. 294. 1979.
- [170] TREUEL, Lennart et al. Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 16, n. 29, p. 15053-15067, 2014.
- [171] AKBARZADEH, Abolfazl; SAMIEI, Mohammad; DAVARAN, Soodabeh. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale research letters*, v. 7, p. 1-13, 2012.
- [172] BHATTACHARJEE, Sourav et al. Cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with different size and surface characteristics. *Particle and fibre toxicology*, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2012.
- [173] BHATTACHARJEE, Sourav et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Particle and fibre toxicology*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2010.
- [174] FAVI, Pelagie Marlene et al. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 103, n. 11, p. 3449-3462, 2015.
- [175] FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science* 241, 20–22 (1973). <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- [176] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, v. 235, p. 337-351, 2016.
- [177]. RÓZ, A. L. et al. *Técnicas de nanocaracterização*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

- [178] LENG, Y. *Materials Characterization*. [S.l.]: Wiley, 2013.
- [179] MARTINHO, J. M. G. *Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. Química*, v. 52, p. 44-48, 1994.
- [180] Michen B, Geers C, Vanhecke D, Endes C, Rothen-Rutishauser B, Balog S, Petri-Fink A. Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. *Sci Rep*. 2015 May 12;5:9793. doi: 10.1038/srep09793. PMID: 25965905; PMCID: PMC4428270.
- [181] HAISS, Wolfgang et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV– Vis spectra. *Analytical chemistry*, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.
- [182] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino**  
**Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000**  
**Fone (11) 2810-1570 ou (11) 2810-1572**  
**SÃO PAULO – São Paulo – Brasil**  
**<http://mprofissional.ipen.br>**

**O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) do Governo Federal.**