



**Síntese e caracterização toxicológica de diferentes
tipos de nanopartículas de ouro.**

Estudos *in vitro* e *in vivo*.

Joana Daniela da Silva Costa

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao grau de Mestre em
Controlo de Qualidade, apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto**

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lourdes
Pinho de Almeida Souteiro Bastos e da Professora Doutora Helena Maria da
Ferreira Costa Ferreira Carmo

Porto, Outubro de 2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS
PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO
ESCRITA DO CANDIDATO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Aos meus pais e irmã

Agradecimentos

Já dizia Antoine de Saint-Exupéry, “Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”, e no fim desta jornada, não podia esquecer aqueles que se foram juntando, que foram deixando um pouco de si, que foram percorrendo este caminho comigo.

Primeiro quero agradecer à Doutora Maria de Lourdes Bastos, na qualidade de minha orientadora, por todo o apoio, paciência, compreensão e por todos os conhecimentos que partilhou comigo, mostrando-me que o valor das coisas não é dependente do seu tamanho, de coisas pequeninas podem surgir grandes feitos.

Depois, como não poderia deixar de ser, quero agradecer à Doutora Helena Carmo, que mais do que minha co-orientadora, foi muitas vezes a voz da experiência e da sabedoria, que nos momentos menos bons soube dar a palavra certa, fazendo-me sempre ver que em Ciência nem tudo é perfeito, nem tudo corre como esperado.

Agradecer também à Doutora Eulália Pereira pela forma calorosa como me recebeu e sempre me ajudou, e a todos no Laboratório de Química Inorgânica, em especial ao Miguel Almeida e ao Pedro Quaresma, aos quais estou grata, não só por todo o conhecimento científico mas também pelas gargalhadas, nos dias em que as estrelas teimavam em não brilhar! Sem eles nada disto seria um “*Great Success!!*”.

Como não podia deixar de ser, à Diana Dias da Silva, minha Fada das Células! Nada disto seria possível sem a sua incansável paciência e árduo trabalho! Agradeço não só todo o tempo despendido com as “minhas” nanopartículas, muitas vezes em dias de trabalho das 5h às 19h, mas também todos os cafés, todas as conversas, tudo aquilo que fui aprendendo ao longo destes meses, e que pretendo levar para a vida!

À minha Sunshine e romena preferida, Maria Enea, o meu profundo obrigado pelas horas que passamos juntas, por partilhar comigo o desespero, quando ao fim de imensas tentativas continuávamos a não ter partículas, pelas horas na cultura celular, pelos bons almoços com longas conversas, por ser, no final de contas, a minha mais fiel companheira nesta jornada.

A todas as outras pessoas do Laboratório de Toxicologia que me acolheram de braços abertos e me foram ajudando de alguma forma, em especial à Engenheira Elisa Soares pelo tratamento das amostras e quantificação do ouro e à Maria João Valente por me ter cedido gentilmente os hepatócitos primários de rato. A todos, o meu sincero obrigado.

E porque os quilómetros desta jornada não foram só percorridos no laboratório, o meu obrigado a todos os meus amigos, com especial ênfase àqueles que tinham também a sua jornada a cumprir, mas que isso nunca foi impedimento para me darem a mão quando as forças me faltaram. Obrigada minhas baby girls pelos almoços, pelas gargalhadas, pelos incentivos, por

nunca me deixarem esquecer que no fim da tempestade vem a bonança. Que nunca nos falte a vontade e um ombro amigo, e vamos conquistar o mundo!

Por fim não poderia esquecer o papel, muitas vezes sem o devido reconhecimento, que os meus pais e irmã tiveram durante este ano. Sem vocês, todo este caminho seria mais sinuoso, e a probabilidade de já ter deitado a toalha por terra é muito alta. Mais do que agradecer todo o amor, todo o afeto, todo o colinho que sempre me deram, tenho que agradecer a compreensão pelas ausências, pelas respostas tortas, pela paciência com que sempre lidaram com os meus desabaços, muitas vezes sem perceberem muito bem o que eu dizia. Aos meus pais, agradecer também por sempre me fazerem ver que não podemos desistir à primeira dificuldade, sendo os meus melhores professores e exemplos de sacrifício e força. À minha irmã, um pedido de desculpa por passar tanto tempo no teclado e um muito obrigado, por no seu prisma de criança, encontrar sempre a solução para o problema mais complicado.

Resumo

No decorrer deste trabalho foram sintetizadas AuNPs com duas formas diferentes (esféricas e em forma de estrela), recorrendo-se a metodologias de síntese com base em metodologias de crescimento mediadas por núcleos de crescimento, apresentando tamanhos e revestimentos diferentes: as AuNPs em forma de estrela apresentavam-se revestidas com 11-mercaptoundecanóico (MUA) e as AuNPs esféricas revestidas com citrato de sódio ou MUA.

Depois de sintetizadas e caracterizadas, foi avaliada a toxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nos modelos celulares HepaRG (antes e após diferenciação celular), Caco-2 e hepatócitos primários de rato, utilizando os ensaios de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), incorporação do vermelho neutro (VN) e libertação da lactato desidrogenase (LDH) (no caso das Caco-2), 4 e 24 horas após incubação. Foi ainda avaliado o efeito da forma (esférica e estrela) na biodistribuição de AuNPs 24 horas após administração oral a ratos.

Os resultados obtidos indicaram que as AuNPs utilizadas apresentaram toxicidade para os modelos celulares em estudo nas concentrações mais altas utilizadas no decorrer deste trabalho. Mostrou-se também que o perfil de toxicidade não foi igual para todos os modelos celulares registando-se menor toxicidade para as células Caco-2. Foi ainda possível avaliar o efeito de parâmetros como o tamanho, revestimento e forma registando-se que a forma das AuNPs afetou a viabilidade celular em todos os modelos celulares em estudo, com as AuNPs esféricas a mostrarem-se mais tóxicas. Contudo, a forma pareceu não afetar o perfil de biodistribuição das AuNPs após administração oral em ratos.

Palavras-chave: síntese mediada por núcleos de crescimento, nanopartículas de ouro (AuNPs), revestimentos, AuNPs esféricas, AuNPs em forma de estrela, citotoxicidade, células HepaRG, células Caco-2, hepatócitos primários de rato.

Abstract

In this work, AuNPs with two different shapes were synthesized (spherical and star-shaped AuNPs), using different methodologies based upon seed-mediated growth synthesis. AuNPs with different sizes and coatings were synthesized: star-shaped AuNPs were coated with 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) and spherical AuNPs were citrate or MUA-coated.

After synthesized and characterized, the toxicity of the spherical and star-shaped AuNPs were evaluated in cellular models: HepaRG cells (before and after cellular differentiation), Caco-2 cells and primary rat hepatocytes, using the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium (MTT) reduction, neutral red (NR) and lactate dehydrogenase (LDH) release (in the case of Caco-2 cells) assays, 4 and 24 hours after incubation. It was also assessed the effect of the shape (sphere and star) in the AuNPs biodistribution 24 hours after oral administration to rats.

The results indicate that the AuNPs used in this work, are toxic to the tested cellular models at the highest concentrations. It was also shown that the toxicity profile is not the same for all cellular lines with the Caco-2 cell line being more resistant to the cytotoxic effects of the AuNPs. It was also possible to assess the effect of parameters such as size, shape and coating on cellular viability. In all cellular models sphere-shaped AuNPs showed higher toxicity as compared with star-shaped AuNPs. However, the AuNPs shape does not seem to significantly affect the biodistribution profile of the AuNPs after oral administration to rats.

Keywords: Seed-mediated growth synthesis, Gold nanoparticles (AuNPs), coatings, spherical-AuNPs, star-shaped AuNPs, cytotoxicity, HepaRG cells, Caco-2 cells, primary rat hepatocytes.

ÍNDICES

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nanotecnologia	3
1.1.1 Nanotecnologia e produtos de consumo	5
1.1.2 Nanotoxicologia	6
1.2 Os Nanomateriais	8
1.2.1 Nanomateriais inorgânicos	9
1.2.2 Nanomateriais orgânicos	9
1.2.3 Nanomateriais híbridos	9
1.3 Técnicas de síntese de nanomateriais	10
1.4 Caracterização de nanomateriais	11
1.4.1 Técnicas microscópicas	11
1.4.2 Técnicas espectroscópicas	12
1.4.3 Técnicas de separação	13
1.5 Nanopartículas de ouro (AuNPs)	13

1.5.1 Características e propriedades óticas das AuNPs	14
1.5.2 Síntese de AuNPs	16
1.5.2.1 Síntese de AuNPs <i>in situ</i>	17
1.5.2.2 Síntese de AuNPs pelo método de crescimento mediado por núcleos de crescimento	18
1.5.3 Funcionalização de AuNPs	19
1.6 Toxicidade das AuNPs	21
1.6.1 Mecanismos de internalização de nanopartículas	21
1.6.2 Mecanismos de citotoxicidade de AuNPs	23
1.6.3 Estudos de toxicidade de AuNPs <i>in vitro</i>	24
1.7 Biocinética das AuNPs	27
1.7.1 Absorção de nanopartículas	27
1.7.1.1 Absorção pulmonar de nanopartículas	28
1.7.1.2 Absorção de nanopartículas via trato gastrointestinal	28
1.7.1.3 Absorção dérmica de nanopartículas	30
1.7.2 Biodistribuição de nanopartículas	31
1.7.3 Metabolismo de nanopartículas	35
1.7.4 Excreção de nanopartículas	36
2. SECÇÃO EXPERIMENTAL	39
2.1 Objetivos	41
2.2 Materiais e Instrumentação	42
2.2.1 Síntese de AuNPs	42
2.2.2 Cultura Celular	43

2.2.3 Ensaio <i>in vivo</i>	45
2.3 Síntese, caracterização e funcionalização de AuNPs	45
2.3.1 Síntese de AuNPs esféricas pelo método de redução pelo citrato de sódio	45
2.3.2 Síntese de AuNPs em forma de estrela usando uma estratégia de crescimento mediado por núcleos de crescimento	47
2.3.2.1 Determinação da concentração em nanopartículas da suspensão de núcleos de crescimento	49
2.3.3 Caracterização das suspensões de AuNPs	49
2.3.3.1 Espectrofotometria de absorção de UV/Vis	50
2.3.3.2 TEM	50
2.3.3.3 DLS e Potencial zeta	50
2.3.3.4 EAA-AE	52
2.3.4 Funcionalização das AuNPs esféricas	53
2.4 Estudos de citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
2.4.1 Modelos celulares em estudo	54
2.4.1.1 Células HepaRG diferenciadas e não diferenciadas	54
2.4.1.2 Células Caco-2	55
2.4.1.3 Hepatócitos primários de rato	56
2.4.2 Ensaio de viabilidade celular	57
2.4.2.1 Ensaio de redução do MTT	58
2.4.2.2 Ensaio de incorporação do VN	58
2.4.2.3 Ensaio de libertação de LDH	59
2.4.3 Análise estatística	59

2.5 Estudos <i>in vivo</i> sobre a influência da forma no perfil de biodistribuição de AuNPs	60
2.5.1 Modelo animal e condições experimentais	60
2.5.2 Determinação do conteúdo em ouro nos órgãos recolhidos por EAA-AE	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Síntese e caracterização das AuNPs sintetizadas	65
3.1.1 Caracterização por espectrofotometria de UV/Vis	66
3.1.2 Caracterização por TEM	69
3.1.3 Caracterização por medições de dispersão de luz (diâmetro hidrodinâmico) e potencial zeta	71
3.2 Avaliação da citotoxicidade das AuNPs	74
3.2.1 Avaliação da viabilidade celular após incubação com as AuNPs	75
3.2.1.1 Ensaios de citotoxicidade em células HepaRG não-diferenciadas após incubação com as AuNPs	76
3.2.1.2 Ensaios de citotoxicidade em células HepaRG diferenciadas após incubação com as AuNPs	79
3.2.1.3 Ensaios de citotoxicidade em células Caco-2 após incubação com as AuNPs	81
3.2.1.4 Ensaios de citotoxicidade em hepatócitos primários de rato após incubação com as AuNPs	84
3.3 Perfil de biodistribuição das AuNPs <i>in vivo</i> após administração oral	92
4. CONCLUSÕES	95
5. BIBLIOGRAFIA	101
6. ANEXOS	119

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1. A escala nanométrica.	4
Figura 2. Técnicas para a produção de nanomateriais: técnicas "bottom-up" (de baixo para cima) e "top-down" (de cima para baixo).	10
Figura 3. Representação esquemática da interação dos eletrões da banda de condução com o campo eletromagnético de uma nanopartícula metálica.	15
Figura 4. Ilustração do método de síntese pelo método de redução do citrato em solução aquosa.	17
Figura 5. Diferentes abordagens para a funcionalização de nanopartículas: A – Revestimento com uma monocamada de ligando com elevada estabilidade termodinâmica; B – Adsorção superficial de um surfactante ou um polímero de forma a promover repulsões eletrostáticas e/ou estéricas inter-partícula para manter a estabilidade cinética da dispersão de nanopartículas; C – Revestimento com moléculas de forma a tornar a nanopartícula funcional, nomeadamente pela capacidade de se ligar a elementos específicos de reconhecimento molecular ou modificando a sua hidrofília.	20
Figura 6. Estrutura química do ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA).	20
Figura 7. Representação esquemática das principais vias de internalização de nanopartículas pelas células.	22
Figura 8. Imagens das soluções coloidais de AuNPs resultantes do método de redução por citrato. À esquerda, a solução coloidal com AuNPs com tamanho maior apresenta-se mais turva do que a solução coloidal com AuNPs de menor tamanho, à direita.	47
Figura 9. Imagem representativa das soluções coloidais de AuNPs em forma de estrela, apresentando a cor azulada característica das AuNPs com esta forma.	49
Figura 10. Representação esquemática do potencial zeta à superfície de uma partícula.	51
Figura 11. Fotografia das células HepaRG: à esquerda sem diferenciação e à direita após 15 dias de diferenciação em meio suplementado com 2% de DMSO.	55
Figura 12. Fotografia das células Caco-2.	56
Figura 13. Fotografia dos hepatócitos primários de rato após isolamento.	56
Figura 14. Comparação entre uma solução coloidal de AuNPs macroscopicamente com bom aspeto e a solução coloidal de AuNPs que se estragou.	65
Figura 15. Espectros de absorção de UV/Vis das AuNPs esféricas.	67
Figura 16. Espectros de absorção de UV/Vis das AuNPs em forma de estrela sintetizadas neste trabalho. Os espectros A e B correspondem às soluções coloidais	

sintetizadas com rácio 1,2 e o espectro C às AuNPs em forma de estrela com diâmetro maior. 68

Figura 17. Imagens de TEM representativas das amostras de AuNPs esféricas e respectivos histogramas de distribuição de tamanhos. 69

Figura 18. Imagens de TEM representativas das amostras de AuNPs em forma de estrela e respectivos histogramas de distribuição de tamanhos. 70

Figura 19. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nas células HepaRG não diferenciadas, pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D). 76

Figura 20. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nas células HepaRG diferenciadas pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D). 79

Figura 21. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nas células Caco-2 pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D). 81

Figura 22. Avaliação da citotoxicidade nas células Caco-2, pela libertação da LDH para o espaço extracelular, das AuNPs esféricas e em forma de estrela às 4 (A) e 24 horas (B) de incubação. 82

Figura 23. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nos hepatócitos primários de rato pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D). 84

Figura 24. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 15 nm (Citrato) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS 121

Figura 25. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 15 nm (MUA) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS. 121

Figura 26. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 60 nm (Citrato) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS. 121

Figura 27. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 70 nm (Citrato) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS. 122

Figura 28. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Estrela ≈ 50 nm (A) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS. 122

Figura 29. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Estrela ≈ 50 nm (B) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS. 122

Figura 30. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Estrela ≈ 60 nm (C) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS. 123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Condições analíticas usadas para a quantificação de ouro por EAA-AE.	53
Tabela 2. Volumes de suspensão de AuNPs administrados para uma dose de 0,6 mg/kg, tendo em conta o peso do animal.	60
Tabela 3. Valores de diâmetro obtidos por TEM, DLS e potencial zeta das AuNPs utilizadas no decorrer deste trabalho. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.	72
Tabela 4. Distribuição de ouro pelos diferentes órgãos e tecidos de rato, 24 horas após a administração oral de AuNPs esféricas revestidas com citrato e em forma de estrela revestidas com MUA.	93
Tabela 5. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, das células HepaRG não diferenciadas após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.	124
Tabela 6. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, das células HepaRG diferenciadas após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.	125
Tabela 7. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, e percentagem de libertação de LDH para o espaço extracelular, das células Caco-2 após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.	126
Tabela 8. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, dos hepatócitos primários de rato após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag⁺	Ião Prata
AgNO₃	Nitrato de Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata
ATP	Adenosina Trifosfato
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAA	Espectroscopia de Absorção Atômica
EAA-AE	Espectroscopia de Absorção Atômica por Atomização Eletrotérmica
EDTA.4Na	Ácido Etilenodiaminotetracético, Sal Tetrassódico
FBS	Soro Fetal Bovino
HAuCl₄	Ácido Tetracloroáurico
HBSS	<i>Hanks Balance Salt Solution</i> (Solução salina)
HCl	Ácido Clorídrico
HNO₃	Ácido Nítrico
H₂O₂	Peróxido de Hidrogénio
LDH	Lactato Desidrogenase
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MUA	Ácido 11-Mercaptoundecanóico
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaOH	Cloreto de Sódio
PAA	Poli- (ácido acrílico)
PAH	Poli (hidrocloreto de alilamina)
PDADMAC	Poli-cloreto de Dialildimetilamônio
PEG	Polietileno Glicol
PES 0,22 µm	Membrana de polietersulfona com poro com diâmetro de 0,22 µm
PSS	Poli-4-estinenosulfonato de Sódio
QD	<i>Quantum dots</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TPPMS	Monossulfonato Trifenilfosfatado
TPPTS	Trifenilfosfato Tris-sulfonado
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VN	Vermelho Neutro
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilido
λ	Comprimento de Onda

1.

INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

Em 1959, o físico norte-americano Richard Feynman introduz pela primeira vez o conceito de nanotecnologia no seu trabalho “*There’s a plenty of Room at the Bottom*” mostrando novas maneiras de pensar sobre a manipulação e controlo de materiais numa escala tão pequena quanto a escala atómica e molecular (1).

O termo “Nanotecnologia” aparece apenas em 1974, proferido pelo professor Norio Taniguchi, para descrever as tecnologias que permitem a construção de materiais à escala nanométrica. Desde então, muito evoluiu, com a nanotecnologia a ser considerada o próximo passo em ciência, tratando-se de uma ciência multidisciplinar integrando conhecimentos de Engenharia com conhecimentos nas áreas da Química, Biologia e Física, associando-se muitas vezes o termo Nanotecnologia a materiais inovadores e altamente promissores (2).

Assim, o impacto socioeconómico da nanotecnologia em certas atividades industriais tem vindo a crescer, com um grande número de produtos de consumo contendo nanomateriais na sua composição, já disponíveis no mercado (2; Project on Emerging Nanotechnologies (2014). Consumer Products Inventory. Acedido em 06/08/2015, em <http://nanotechproject.org/cpi>). Mas a pesquisa científica e tecnológica em nanotecnologia parece mostrar avanços e resultados promissores em áreas tão diversas como a eletrónica, medicina e saúde, energia, biotecnologia e indústria alimentar, fornecendo às diferentes indústrias a capacidade de criar produtos mais confiáveis, mais eficientes, mais seguros, amigos do ambiente e, em muitos casos, produtos cuja produção seria impossível de outra forma (4). Assim, parece cada vez mais que a nanotecnologia será a próxima revolução industrial.

Para um material ser considerado numa escala nanométrica deve ter pelo menos uma das dimensões externas com tamanho igual ou inferior a 100 nm, sendo que 1 nm corresponde a 10^{-9} m (5). Em termos comparativos, um único fio de cabelo humano tem cerca de 80 000 nm de largura e um glóbulo vermelho 7 000 nm, enquanto, uma molécula de água apresenta 0,3 nm de diâmetro (6) (Figura 1). Assim se percebe que os nanomateriais podem ocorrer naturalmente na natureza. Por exemplo, a molécula de ADN é considerada nanomaterial, uma vez que apresenta largura de 2,5 nm (7). Outros exemplos são os constituintes do leite, como as caseínas, a lactose e as proteínas do soro, com dimensões entre 0,5 e 300 nm (8). Os nanomateriais podem ainda ocorrer de forma accidental ou serem propositadamente manufaturados.

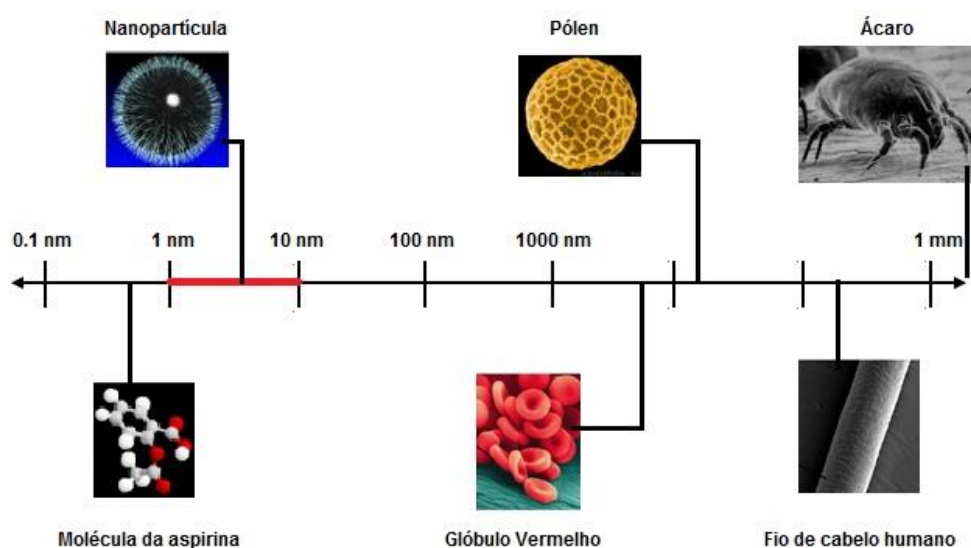


Figura 1. A escala nanométrica. Adaptado de <https://www.vet.purdue.edu/cpr/>

Contudo, devido à falta de uma definição oficial, muitas são as definições dadas ao termo Nanotecnologia, bem como a termos associados como “Nanociência” ou “Nanomaterial”. Assim, num relatório de 2004, a Sociedade Real e a Academia Real de Engenharia Britânicas (6) definiram os termos anteriores da seguinte forma:

“Nanociência é o estudo dos fenómenos e manipulação de materiais nas escalas atômica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente relativamente a uma escala superior.”

“A Nanotecnologia foca-se no desenho, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas confinando a forma e o tamanho à escala nanométrica.”

Da mesma forma, em 2011 a Comissão Europeia define “Nanomaterial” como um “material natural, accidental ou manufaturado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou aglomerado, e cuja distribuição número-tamanho apresenta pelo menos 50% das partículas com uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm” (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm. Acedido a 06/08/2015).

O crescente interesse em torno da nanotecnologia e dos nanomateriais deve-se ao facto destes materiais apresentarem características significativamente diferentes dos materiais numa escala maior. Por exemplo, a diminuição do tamanho tem sido associado ao aumento da reatividade (química, elétrica, etc.) do material devido ao aumento da área de superfície específica (em alguns casos, materiais que são quimicamente inertes, quando produzidos em escala nanométrica, tornam-se reativos) (6).

1.1.1 Nanotecnologia e produtos de consumo

O crescimento exponencial da nanotecnologia tem levado à aplicação de nanomateriais numa variada gama de produtos de consumo (produtos com os quais o público em geral contacta diretamente), como por exemplo os produtos provenientes da indústria alimentar, e produtos utilizados na área da medicina e saúde.

Na indústria alimentar, a nanotecnologia tem sido aplicada ao longo da cadeia de produção alimentar desde a agricultura, passando pelo processamento e embalamento alimentar, podendo chegar ao consumidor final. Encontra ainda aplicações na área da suplementação alimentar. Algumas dessas aplicações incluem o aumento da absorção de nutrientes, nanossistemas de cedência de biocompostos, nanoencapsulamento de sabores e/ou aromas para melhoria sensorial de produtos, sensores para a deteção de agentes patogénicos ou gases, estabilização de compostos ativos, proteção contra a oxidação e extensão do tempo de validade por via do embalamento ativo (9).

Com a aplicação de inovações nanotecnológicas a nível da medicina e saúde, apareceu uma nova área de estudos que tem sido intensamente explorada, a nanomedicina. As potenciais aplicações médicas da nanotecnologia destinam-se predominantemente ao diagnóstico e monitorização, mas também à obtenção de nanossistemas de cedência de fármacos (10). Por exemplo, para diagnóstico, é esperado que os nanomateriais e nanodispositivos identifiquem a patologia num estado precoce, dando a oportunidade de intervenção específica ainda antes da deteção por via sintomática. Assim, a nanomedicina apresenta oportunidades únicas na luta contra várias doenças como cancro, diabetes, doenças degenerativas e infeções por bactérias, fungos e vírus.

A aplicação da nanotecnologia estende-se a outras áreas de produtos de consumo além das descritas. A indústria cosmética (11) e têxtil (12) são também áreas onde a nanotecnologia tem sido aplicada para a criação de produtos inovadores e que correspondam às expectativas elevadas dos consumidores. Assim, a exposição humana

a estes materiais, de forma intencional ou não, parece inevitável, surgindo então dentro da nanotecnologia uma nova área de interesse e de extensiva pesquisa, a nanotoxicologia.

1.1.2 Nanotoxicologia

A par da enorme versatilidade dos nanomateriais como fonte de valor, estes novos materiais têm levantado grandes questões relativamente à sua segurança. Apesar da intensa investigação, as certezas relativamente à sua segurança ainda não existem uma vez que novos nanomateriais, com novas propriedades físico-químicas, estão continuamente a ser produzidos, sendo que, cada nanomaterial comporta-se como um novo material e a extrapolação de informação toxicológica de um tipo de nanomaterial para outro tipo não é possível. É então preciso avaliar os possíveis riscos para a segurança e saúde provenientes da utilização destes materiais.

Cientes desta problemática, em 2006, Maynard et al. (13) propuseram um conjunto de cinco grandes “desafios” que deviam ser entendidos como estratégias de estimulação à investigação para outros grupos que se focassem na segurança dos nanomateriais:

- Desenvolvimento de instrumentação com capacidade de monitorizar a exposição a nanomateriais via ar e água;
- Desenvolvimento e validação de métodos para avaliação da toxicidade de nanomateriais manufaturados;
- Desenvolvimento de modelos capazes de prever o impacto dos nanomateriais na saúde da população e ambiental;
- Desenvolvimento de sistemas robustos para a avaliação do impacto ambiental e na saúde durante todo o “ciclo de vida” do material;
- Desenvolvimento de programas de investigação estratégicos focados nesta temática.

Para dar resposta à necessidade de conhecer os perigos associados à utilização da nanotecnologia e dos nanomateriais, surge então uma nova disciplina que junta conhecimentos quer da nanotecnologia, quer da toxicologia, a nanotoxicologia, que deverá estudar os efeitos adversos dos nanomateriais nos organismos vivos e nos

ecossistemas mas também focar-se na prevenção e atenuação desses efeitos adversos (14).

Uma extensiva caracterização das propriedades dos nanomateriais que incluem o tamanho, forma, estado de aglomeração/agregação, propriedades de superfície como a carga ou agentes de revestimento, é uma ferramenta essencial para a determinação da correta correlação entre as propriedades físico-químicas dos nanomateriais e a sua atividade biológica.

A determinação das diferentes vias de exposição do organismo aos nanomateriais é outro aspeto a ter em conta (15). A exposição pode ocorrer por várias vias que incluem a inalação, injeção (subcutânea, intraperitoneal e intravenosa), a ingestão e dérmica. É também importante saber se a exposição é esporádica ou continuada, pois os efeitos toxicológicos podem ser diferentes.

A bateria de ensaios para prever os potenciais riscos da exposição humana a nanomateriais, é constituída por diferentes modelos para determinação da extensão de exposição e toxicidade, nomeadamente modelos *in vitro* e *in vivo* (15).

Os modelos *in vitro* são conhecidos por serem sistemas biológicos bastante simplificados, capazes de uma avaliação dos efeitos dos xenobióticos e dos nanomateriais de uma forma rápida, de baixo custo, de fácil execução, controlo e interpretação dos resultados obtidos, sem as restrições éticas que os ensaios *in vivo* levantam (16). A sua principal vantagem reside no facto de permitirem a elucidação de mecanismos de toxicidade. Utilizam geralmente uma só linha celular, contudo é possível aumentar a complexidade destes ensaios usando múltiplas linhas celulares de forma a tentar mimetizar o que ocorre *in vivo*. Mas estes ensaios são apenas capazes de utilizar uma combinação de um número muito reduzido de linhas celulares, não sendo credível que estes ensaios consigam efetivamente replicar as complexas interações que ocorrem entre os diferentes tipos de células *in vivo* existentes num órgão, ou entre diferentes órgãos. Podem ainda utilizar células isoladas diretamente de animais, células primárias, que teoricamente fornecerão resultados de toxicidade mais fidedignos, mas implicam o sacrifício do animal, pelo que as linhas celulares imortalizadas são preferidas em detrimento das linhas primárias (17). Contudo, apesar de todas as implicações éticas, só ensaios *in vivo* podem dar respostas concretas para questões tão complexas como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de nanomateriais (15). Mas ambos os modelos de estudo apresentam limitações e muitas vezes, quando comparados os resultados provenientes de cada um, é notória uma grande discrepância,

pelo que a extrapolação dos resultados de um modelo para outro não é possível (17). Mesmo entre ensaios *in vivo* (e *in vitro*) são muitas as discrepâncias, como por exemplo diferenças entre doses/concentrações e duração de exposição aplicadas. Apesar de todo o avanço, este campo de investigação ainda é relativamente novo e ainda é preciso percorrer um longo caminho.

1.2 Os Nanomateriais

Foi há mais de 2000 anos atrás que os Romanos, ainda que sem conhecimento científico, descobriram que a inclusão de quantidades muito pequenas de ouro em vidro, quer em forma de metal quer em forma de sal, produzia uma cor vermelha intensa se o vidro fosse tratado convenientemente com calor. Este fenómeno deve-se à formação de nanopartículas metálicas no vidro, que se formam quando este é aquecido, que são demasiado pequenas para dispersar a luz visível, mantendo o vidro a sua transparência (4). Um artefacto dessa altura e que suscita grande interesse é a taça de Lycurgus, feita de vidro do tipo sódico-cálcico com nanopartículas de ouro e prata que reflete uma cor esverdeada e transmite uma cor avermelhada (18). É a incorporação destes nanomateriais que lhe confere este efeito.

Nas últimas décadas, com o aumento das aplicações da nanotecnologia, são cada vez mais os produtos produzidos com componentes na escala nanométrica. Estes nanomateriais têm sido classificados na literatura de várias maneiras (19). Por exemplo, podem ser classificados segundo a sua origem em nanomateriais que ocorrem naturalmente, acidentalmente ou como nanomateriais manufaturados.

Por outro lado, podem ser classificados segundo a sua homogeneidade, em termos de composição química ou dimensão, em homogéneos e heterogéneos. Nanomateriais idênticos são aqueles que apresentam a mesma composição química e a mesma dimensão sendo que materiais com a mesma composição mas de diferentes dimensões, geralmente apresentam propriedades diferentes.

Relativamente à sua natureza ou composição química, podemos classificar os nanomateriais em inorgânicos, orgânicos ou híbridos. Esta é a classificação mais utilizada na literatura.

1.2.1 Nanomateriais inorgânicos

Dentro da categoria dos nanomateriais inorgânicos encontram-se nanopartículas de metais de transição como o ouro e a prata. As nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs) são das partículas mais estudadas e usadas.

Outras nanopartículas inorgânicas incluem óxidos metálicos como o dióxido de titânio, dióxido de zinco, óxido de alumínio, óxidos de ferro, entre outros. As nanopartículas de sílica são também muito utilizadas.

Há ainda que referir a existência de nanocristais semicondutores comumente conhecidos por “*quantum dots*” (QDs) (20) constituídos por cádmio, selênio e outros elementos dos grupos II a VI da tabela periódica e que apresentam propriedades óticas, eletrônicas, eletroquímicas e catalíticas excepcionais que lhes conferem grande interesse (19).

1.2.2 Nanomateriais orgânicos

Os nanomateriais orgânicos incluem os nanomateriais constituídos por átomos de carbono, como é o caso dos fulerenos (moléculas de carbono em forma de caixa que contêm anéis pentagonais e hexagonais, e incluem uma gama de isómeros sendo o C₆₀ e C₇₀ os mais estudados), os QDs de grafeno e as nanofibras de carbono com diâmetros na escala nanométrica (19). Outros nanomateriais com base em átomos de carbono incluem os nanodiamantes, nanocones e os nanotubos com uma, duas ou múltiplas camadas de grafeno.

Outros nanomateriais orgânicos que têm despertado interesse, com maior incidência na área alimentar e na medicina, são os lipossomas, nanomicelas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas (21).

1.2.3 Nanomateriais híbridos

Os nanomateriais híbridos caracterizam-se pela utilização de dois tipos de nanocomponentes, formando um único nanossistema. Estes nanomateriais juntam as propriedades dos dois componentes, que podem ser complementares ou que estabelecem efeitos sinérgicos entre si, de forma a obter as características pretendidas (19).

São exemplos a ligação de biomoléculas a nanopartículas metálicas (22) e a ligação de moléculas inorgânicas a matrizes poliméricas orgânicas para obtenção de propriedades térmicas, mecânicas, elétricas e óticas melhoradas (23,24).

1.3 Técnicas de síntese de nanomateriais

São várias as técnicas capazes de produzir diferentes nanomateriais. Estas técnicas podem ser classificadas em técnicas “*bottom-up*” e “*top-down*”, e diferenciam-se pelo modo com que abordam a produção do nanomaterial (Figura 2).

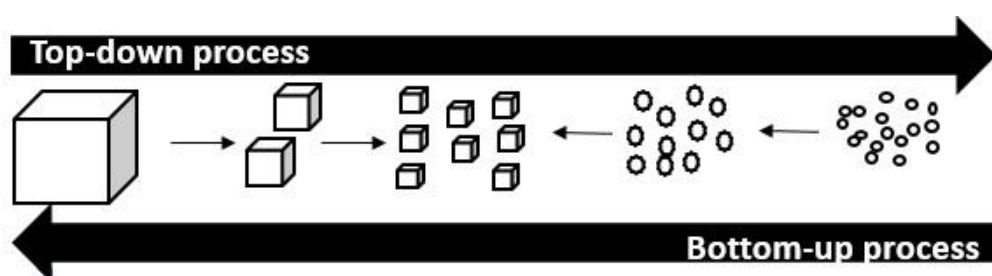


Figura 2. Técnicas para a produção de nanomateriais: técnicas “*bottom-up*” (de baixo para cima) e “*top-down*” (de cima para baixo).

As técnicas de “*bottom-up*” baseiam-se na produção de nanoestruturas a partir de estruturas menores, como átomos e moléculas, sendo que estas estruturas menores são desenhadas de forma a terem características especiais, que as tornam capazes de formar espontaneamente estruturas supra-moleculares organizadas e bem definidas (25).

As técnicas de “*top-down*” partem do material à escala macroscópica, sendo criadas progressivamente estruturas mais pequenas por processos físicos, como a litografia, até se obter o material desejado em escala nanométrica (26).

As técnicas “*top-down*” têm a vantagem de permitir a produção de nanomateriais com tamanhos e dispersão de tamanhos bem definidos. Contudo, são necessárias grandes quantidades de material, apresentando baixos rendimentos e elevados consumos energéticos (27).

Por outro lado, as técnicas de “*bottom-up*” são bastante mais simples de implementar, apresentam rendimentos mais elevados e custos energéticos menores. Contudo, devido à necessidade de parar o crescimento de todos os nanomateriais ao mesmo tempo,

podem apresentar uma grande dispersão de tamanhos. Estas técnicas implicam ainda, normalmente, a utilização de um agente que adsorve à superfície dos nanomateriais controlando o seu crescimento. Estes agentes de revestimento, por exemplo surfactantes ou polímeros, são utilizados para evitar a agregação e precipitação dos nanomateriais em suspensão (27).

No caso das nanopartículas metálicas, consoante o seu processo de síntese, podem adquirir diferentes morfologias e tamanhos. Assim, além de ser necessário controlar o tamanho das nanopartículas, é ainda necessário controlar a sua morfologia que dará origem a diferentes propriedades químicas e físicas.

No decorrer deste trabalho, foram utilizadas técnicas que se enquadram na categoria “*bottom-up*”.

1.4 Caracterização de nanomateriais

O desenvolvimento de metodologias analíticas, para a rápida e rigorosa caracterização dos nanomateriais é de especial interesse para o desenvolvimento da nanotecnologia. O conhecimento das características físicas, como por exemplo o tamanho, químicas como a composição, bem como características biológicas como a toxicidade, são essenciais. Assim, são várias as técnicas disponíveis para a caracterização dos nanomateriais e da sua superfície química. As diferentes técnicas podem ser classificadas em técnicas microscópicas, espectroscópicas e de separação (19).

1.4.1 Técnicas microscópicas

Dentro das técnicas microscópicas, as técnicas mais utilizadas para a caracterização de nanomateriais são a microscopia eletrónica de transmissão (TEM), TEM de alta resolução, microscopia eletrónica de varrimento, microscopia de varrimento com sonda, nomeadamente microscopia de força atómica e microscopia de corrente de tunelamento.

Estas técnicas, além das imagens dos nanomateriais, fornecem informações relativas ao estado de agregação, dispersão, tamanho, estrutura e forma dos nanomateriais. No entanto, apresentam a desvantagem de sofrerem da subjetividade do operador, implícita quando este decide qual parte da amostra é fotografada, sendo que para uma avaliação precisa da distribuição de tamanhos é necessário contar e medir um grande número de partículas de forma a obter dados estatísticos fiáveis. Outra desvantagem reside no facto

de estas técnicas serem, no geral, destrutivas ou seja, a mesma amostra não pode ser analisada mais do que uma vez, nem por outro método de avaliação.

1.4.2 Técnicas espectroscópicas

Alguns métodos espectroscópicos têm sido também utilizados para analisar nanomateriais. Por exemplo, técnicas com base em fluorescência são usadas para a análise de nanopartículas com fluorescência nativa forte, sendo caracterizadas pelo seu espectro de absorção ou de fluorescência.

Outra técnica utilizada é a espectroscopia de absorção de ultravioleta/visível (UV/Vis). Esta técnica é utilizada principalmente para a caracterização de nanopartículas metálicas, sendo que o espectro obtido reflete as oscilações das nuvens eletrônicas presentes na interface metal-solução (superfícies de ressonância plasmônica). A concentração de partículas pode ser determinada a partir de medições de absorção, desde que as constantes óticas das nanopartículas sejam conhecidas.

Para determinar a composição química de uma amostra, podem ser usadas técnicas espectroscópicas como a espectroscopia de absorção atômica (EAA), espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido, espectroscopia de emissão ótica por plasma induzido e espectroscopia de massa por plasma induzido, especialmente em análises de nanopartículas metálicas. Apesar de apresentarem limites de detecção baixos, são técnicas destrutivas.

Técnicas de dispersão de luz são muito comuns para determinar o tamanho das partículas. Entre as técnicas de dispersão, a dispersão de luz dinâmica (DLS) é das técnicas mais utilizadas. A DLS apresenta a vantagem de requerer uma operação simples e rápida, com leitura diretamente do aparelho. Contudo, para sistemas polidispersos, esta técnica apresenta limitações na interpretação e análise crítica dos resultados obtidos.

Outras técnicas espectroscópicas utilizadas para a caracterização de nanomateriais incluem espectroscopia vibracional, nomeadamente espectroscopia de Raman e de infravermelho, bem como espectroscopia de ressonância magnética nuclear, entre outras.

1.4.3 Técnicas de separação

Técnicas de separação tais como cromatografia de exclusão pelo tamanho, cromatografia hidrodinâmica, eletroforese capilar, dieletroforese bem como centrifugação e diálise, podem também ser utilizadas para a caracterização de nanomateriais, sendo métodos muito sensíveis.

O método mais utilizado é a cromatografia de exclusão pelo tamanho, contudo, pode ocorrer adsorção irreversível dos nanomateriais em análise à fase estacionária da coluna cromatográfica.

1.5 Nanopartículas de ouro (AuNPs)

As AuNPs são dos nanomateriais mais estudados nas últimas décadas. O grande interesse em torno destas nanopartículas, com diferentes tamanhos e formas, reside no facto de apresentarem características únicas que as tornam de especial interesse. Além das suas propriedades óticas e eletroquímicas, estas nanopartículas são de fácil preparação e modificação (28). As suas propriedades únicas fazem com que estas nanopartículas sejam utilizadas em diversas áreas.

As aplicações biomédicas das AuNPs incluem a libertação de fármacos diretamente no alvo desejado (29). Estes sistemas de cedência de fármacos aumentam a solubilidade, a estabilidade e a biodistribuição do fármaco e ainda podem atuar como reservatórios de fármaco permitindo a sua libertação de forma controlada e sustentável.

A imagem ótica de células e tecidos (30) é outra das aplicações biomédicas das AuNPs. A utilização de AuNPs em imagiologia deve-se à sua superfície de ressonância plasmónica. A aplicação mais tradicional das AuNPs em imagiologia, chamada imunomarcção, envolve a sua conjugação a anticorpos que se vão ligar a antígenos presentes nas células, podendo ocorrer a sua visualização por técnicas de contraste como microscopia de contraste de fase, microscopia de fluorescência ou *X-Ray scattering* (31).

As AuNPs são ainda utilizadas no diagnóstico de patologias como cancro, doença de Alzheimer, hepatite B, tuberculose e diabetes, e na terapia de várias doenças como a artrite reumatoide e diversos tipos de cancro. No combate ao cancro, as AuNPs são utilizadas devido às suas propriedades anti-angiogénese. A angiogénese, processo complexo regulado por diversos fatores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos, consiste

na formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes. Tem um papel crucial no crescimento e difusão do cancro, já que as células cancerígenas têm a capacidade de desregular o equilíbrio entre os fatores pró- e anti-angiogénicos no sentido de promover a angiogénese. Estes novos vasos sanguíneos vão permitir o acesso de oxigénio e nutrientes às células cancerígenas permitindo o seu crescimento e difusão. As AuNPs atuam como inibidores de fatores pró-angiogénicos, como é o caso do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína responsável pela regulação da permeabilidade de vasos sanguíneos cancerígenos (32). Outras terapias associadas a cancro que podem utilizar AuNPs são a terapia por radiofrequência e a terapia por efeito fototérmico das AuNPs (31). Também na artrite reumatoide, as AuNPs atuam como inibidores de fatores pró-angiogénicos, uma vez que a angiogénese tem um importante papel na formação e manutenção desta patologia. Assim, as AuNPs são utilizadas de forma a diminuir a inflamação das articulações associadas à artrite reumatoide.

Na indústria alimentar, as AuNPs são utilizadas, por exemplo, como nanossensores para deteção de contaminantes ou adulterantes em alimentos, por mudanças de cor das nanopartículas na presença dos compostos em questão. É o caso das AuNPs ligadas a ácido cianúrico que se ligam seletivamente a melamina, um adulterante utilizado para inflacionar o teor em proteína em alimentos para animais e formulações infantis. A agregação causada pela melamina causa uma mudança de cor das AuNPs de vermelho para azul (33). Outra aplicação das AuNPs na indústria alimentar refere-se ao seu uso como ensaios colorimétricos altamente sensíveis para a deteção de diferentes agentes patogénicos como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (34).

1.5.1 Características e propriedades óticas das AuNPs

As suspensões coloidais de AuNPs possuem cores intensas, que variam de acordo com o seu tamanho e morfologia, que são dependentes do processo de síntese (32). Assim, dependendo do método de síntese utilizado, podem-se obter nanopartículas isotrópicas como as nanopartículas esféricas ou nanopartículas anisotrópicas como por exemplo em forma de estrela, triângulos, cubos, etc. (31). O controlo destes parâmetros durante o processo de síntese de nanopartículas representa um grande desafio, uma vez que têm uma grande influência nas suas propriedades óticas.

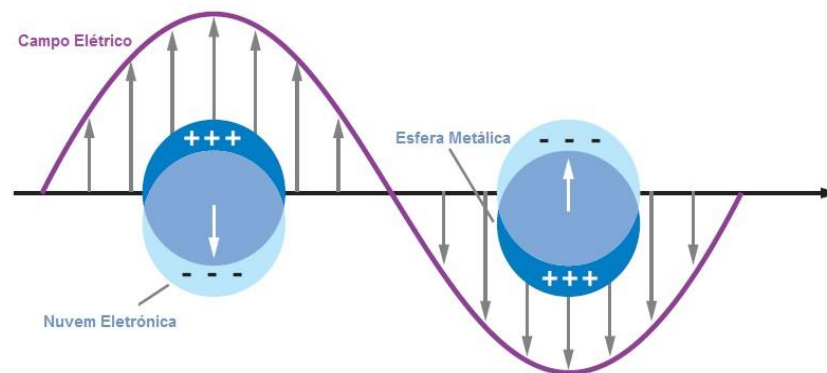


Figura 3. Representação esquemática da interação dos elétrons da banda de condução com o campo eletromagnético de uma nanopartícula metálica. Adaptado de (35).

Na origem das cores intensas que as suspensões coloidais de AuNPs apresentam, e de outras nanopartículas metálicas, está o fenómeno físico de ressonância plasmónica de superfície, resultante da interação do campo elétrico da luz incidente com os elétrons presentes na banda de condução do metal, que promovem a oscilação dos mesmos induzindo a formação de dipolos de AuNPs (Figura 3) (35).

Para o caso de metais com elétrons de condução livre, ou seja elétrons na banda d, como é o caso do ouro, este fenómeno leva a que ocorram absorções fortes na zona do visível. Assim, uma suspensão coloidal de AuNPs esféricas apresenta tipicamente uma banda plasmónica de intensa absorção por volta dos 520 nm, responsável pela sua coloração vermelha (29). Contudo, quando as AuNPs apresentam tamanhos na ordem dos 100 nm, esta banda pode desviar-se para os 600 nm (36).

No caso das nanopartículas metálicas anisotrópicas, como é o caso das AuNPs em forma de bastonete (*rod shaped*) e em forma de estrela, as soluções coloidais apresentam geralmente mais que uma banda de absorção (37). As AuNPs em forma de estrela exibem duas bandas de absorção, que nem sempre são bem definidas devido à fraca monodispersão que estas nanopartículas geralmente apresentam (36). O aparecimento de duas bandas deve-se ao facto do comprimento de onda de ressonância depender da orientação do campo eletromagnético, sendo possíveis oscilações longitudinais e transversais. A ressonância plasmónica destas partículas resulta da hibridização da excitação coletiva dos elétrons do núcleo, e de cada ponta individual da partícula (36).

Outros fatores além do tamanho e forma, podem influenciar a localização das bandas plasmónicas, e consequentemente a cor das suspensões, nomeadamente a distância entre partículas. Quando as partículas se encontram muito próximas, ou quando ocorre agregação das nanopartículas em suspensão, ocorrem alterações na ressonância

plasmónica, pois pode ocorrer interação entre a oscilação de eletrões das partículas em contacto quando há interação com um campo elétrico. Tal pode levar ao desvio da banda plasmónica para maiores comprimentos de onda. A agregação das AuNPs pode então ser detetada macroscopicamente pela mudança de cor da suspensão (19).

1.5.2 Síntese de AuNPs

Historicamente, a utilização de nanopartículas de ouro remonta há muitos séculos atrás na decoração de vitrais de vidro (19).

Do ponto de vista científico, Michael Faraday, há mais de 100 anos, foi o primeiro a sintetizar coloides de ouro, por redução química, a partir de uma solução de cloreto de ouro. No entanto, nas últimas décadas o interesse na síntese de nanopartículas de ouro aumentou, com estas novas técnicas a centrarem-se na capacidade de controlar o tamanho, forma, estrutura e propriedades de superfície destas nanopartículas.

Tal como outros nanomateriais, as AuNPs podem ser preparadas por técnicas “*top-down*” ou técnicas “*bottom-up*”. Na abordagem “*top-down*”, ouro num estado de maior tamanho é sistematicamente partido para dar origem a nanopartículas de ouro do tamanho pretendido. Contudo, esta abordagem não permite um bom controlo do tamanho e forma das nanopartículas, e a sua funcionalização é limitada. Pelo contrário, na abordagem “*bottom-up*” a formação das AuNPs é feita a partir de moléculas individuais envolvendo redução biológica ou química. O método de redução química envolve dois passos: nucleação e crescimento sucessivo. Quando a nucleação e o crescimento são feitos no mesmo processo, ocorre síntese *in situ*; caso contrário, é apelidado por método mediado por núcleos de crescimento (38).

No âmbito deste trabalho, para a síntese de AuNPs, foram utilizados métodos de crescimento mediado por núcleos de crescimento com base na redução química do ouro por ação do citrato de sódio para a síntese de nanopartículas esféricas, e um método sem surfactante, também mediado por núcleos de crescimento, para a síntese de nanopartículas em forma de estrela. É contudo necessário perceber um pouco de que forma ocorre a síntese de AuNPs *in situ*, uma vez que AuNPs sintetizadas por este método são também utilizadas como núcleos de crescimento para o método de crescimento mediado e para posterior funcionalização.

1.5.2.1 Síntese de AuNPs *in situ*

Geralmente, a preparação de AuNPs por redução química envolve duas partes. Na primeira parte ocorre a redução por ação de agentes redutores como boro-hidretos, hidrazina, formaldeído, hidroxilamina, monóxido de carbono entre outros. Na segunda parte ocorre a estabilização por determinados agentes como citrato de sódio, ligandos de enxofre, fósforo ou com base em azoto ou oxigénio, polímeros ou surfactantes (38).

Um dos métodos mais utilizados na síntese de AuNPs é o método de redução pelo citrato, onde o citrato atua como agente de estabilização e como agente redutor (39–41). Neste método, utilizado para a síntese de AuNPs esféricas, a síntese ocorre por via da redução química do ouro, e foi inicialmente descrita por Turkevich et al. (39) em 1951. Contudo, já vários estudos foram conduzidos com o intuito de melhorar o método, tornando-o mais eficiente e passível de controlar mais eficazmente certos parâmetros, como o tamanho, forma e dispersão de nanopartículas.

No método de redução pelo citrato, o ouro proveniente do agente precursor, ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl_4) em solução aquosa e à temperatura de ebulição, é reduzido a ouro metálico por ação do citrato de sódio, um agente redutor fraco (42,43).

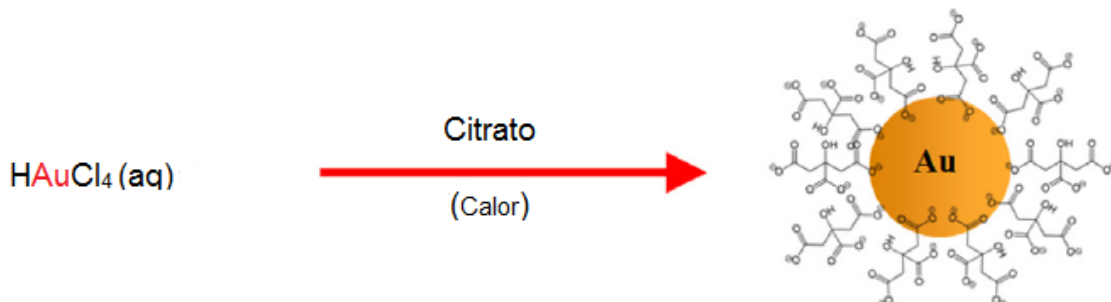


Figura 4. Ilustração do método de síntese pelo método de redução do citrato em solução aquosa. Adaptado de (19).

Além de funcionar como agente redutor, o citrato de sódio funciona também como agente de revestimento. Assim, o citrato é adicionado em excesso ao meio reacional. À medida que ocorre a redução do ouro, o excesso de citrato adicionado vai permitir que ainda haja citrato, que sob a forma de íão citrato carregado negativamente, é adsorvido à superfície das AuNPs.

A adsorção do agente de revestimento, neste caso o citrato, à superfície das AuNPs já formadas, vai prevenir a formação de agregados e o crescimento descontrolado de partículas, uma vez que as AuNPs revestidas em suspensão se vão repelir entre si devido a repulsões electrostáticas. Um agente de revestimento com baixo poder de

adsorção às nanopartículas, ou uma concentração do agente em solução insuficiente para ser adsorvido a toda a superfície das nanopartículas, pode resultar na diminuição das forças repulsivas entre partículas, na sua aproximação e, por fim, levar à agregação. Em alguns casos, são utilizados outros materiais de revestimento como surfactantes ou polímeros como agentes estabilizadores para a prevenção da agregação das nanopartículas em solução (27). A utilização de surfactante na síntese de nanopartículas é também importante para o controlo do crescimento, nomeadamente no controlo do seu tamanho e forma final (44).

A reação deve ser conduzida a temperaturas elevadas, uma vez que o citrato não é capaz de reduzir metais à temperatura ambiente devido ao seu baixo poder redutor. A redução da temperatura de reação afeta drasticamente as nanopartículas sintetizadas, pelo aumento do seu tamanho e formação de nanopartículas de formas irregulares (41).

A partir dos estudos posteriores à síntese descrita por Turkevich em 1951, (41,45) é possível perceber que parâmetros como a temperatura, razão molar entre ouro/citrato, velocidade de agitação e tempo de reação têm efeito direto no aspeto e estabilidade coloidal das nanopartículas. Este é, contudo, um método que se caracteriza pela sua facilidade, rapidez, reprodutibilidade e a partir do qual se obtêm nanopartículas com pouca dispersão, de forma esférica e bastante estáveis.

No entanto, para nanopartículas acima dos 20-30 nm, com este método, a distribuição de tamanhos das nanopartículas formadas não é o mais desejável, e as partículas não são uniformes relativamente à forma (41). Mais recentemente, métodos de síntese usando uma estratégia de crescimento mediado por núcleos de crescimento com base no método clássico de Turkevich, são considerados métodos mais eficientes no controlo do tamanho e forma das AuNPs sintetizadas (46,47).

1.5.2.2 Síntese de AuNPs pelo método de crescimento mediado por núcleos de crescimento

No método de crescimento mediado por núcleos de crescimento as partículas “crescem” passo a passo. Este método envolve, geralmente, dois passos. No primeiro passo os núcleos de crescimento (AuNPs de pequeno tamanho) são sintetizados; no segundo passo, os núcleos de crescimento são adicionados a uma solução de crescimento que contém HAuCl_4 , agentes estabilizadores e redutores. Então o ouro,

recém-reduzido pelos agentes redutores, adsorve à superfície dos núcleos de crescimento, formando partículas maiores.

Os agentes de redução usados no segundo passo, são apenas capazes de reduzir o ouro na presença dos núcleos de crescimento de ouro (que atuam como catalisadores). Assim, o ouro recém-reduzido só é capaz de se formar à superfície dos núcleos de crescimento, sem que ocorra nucleação de novas partículas em suspensão. Este segundo passo pode ser repetido de forma a continuar o processo de crescimento das partículas.

A formação dos núcleos de crescimento de ouro para usar no método de síntese mediado por núcleos de crescimento, é determinante e intrinsecamente relacionada com o tamanho, forma e propriedades da superfície das AuNPs que se pretende sintetizar, características essas que são controladas pela quantidade e natureza do agente redutor e estabilizador usados, bem como com o seu rácio relativamente ao precursor de ouro.

Para a síntese de AuNPs esféricas pelo método de crescimento mediado por núcleos de crescimento, em alguns casos, o citrato de sódio pode ser usado como agente redutor e estabilizador nos diferentes passos (48).

1.5.3 Funcionalização de AuNPs

Tais como outros tipos de nanopartículas, depois de sintetizadas, as AuNPs podem ser funcionalizadas ocorrendo modificações das propriedades de superfície das partículas, conferindo-lhes características específicas ótimas para o fim a que foram destinadas.

A funcionalização de nanopartículas metálicas, como é o caso das AuNPs, é um procedimento frequente e efetuada por diversos motivos, nomeadamente a estabilização de nanopartículas muito reativas, ou com tendência a agregar num determinado meio (solvente) onde estão dispersas, a alteração da superfície das nanopartículas com moléculas bifuncionais constituídas por uma extremidade que promove a ligação à superfície da nanopartícula e outra responsável pelo reconhecimento molecular por parte de moléculas específicas, e por fim, promover o revestimento da nanopartícula com uma monocamada de ligandos com elevada estabilidade termodinâmica (49).

Dependendo do metal e do solvente onde as nanopartículas estão dispersas, é necessário escolher os ligandos certos para a obtenção de nanopartículas estáveis. Os ligandos têm que se ligar à superfície da nanopartícula metálica por interações atrativas

como a quimissorção, a atração eletrostática ou a interação hidrofóbica, geralmente fornecida por uma extremidade do ligando (44).

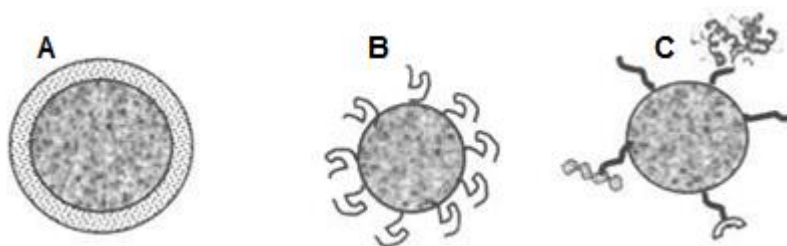


Figura 5. Diferentes abordagens para a funcionalização de nanopartículas: A – Revestimento com uma monocamada de ligando com elevada estabilidade termodinâmica; B – Adsorção superficial de um surfactante ou um polímero de forma a promover repulsões eletrostáticas e/ou estéricas inter-partícula para manter a estabilidade cinética da dispersão de nanopartículas; C – Revestimento com moléculas de forma a tornar a nanopartícula funcional, nomeadamente pela capacidade de se ligar a elementos específicos de reconhecimento molecular ou modificando a sua hidrofilia. Adaptado de (49).

São vários os grupos funcionais com afinidade para superfícies inorgânicas. O exemplo mais famoso é a afinidade do grupo tiol (-SH) pelo ouro. Além do tiol, outros grupos funcionais como o nitrilo (-CN) e amina (-NH₂) têm afinidade por nanopartículas metálicas, e esta característica tem sido útil no âmbito da funcionalização das nanopartículas (50).

Contudo, a funcionalização de AuNPs é mais eficaz com grupos tiol relativamente aos outros grupos mencionados, uma vez que a interação molecular entre o ouro e os grupos que contenham enxofre é bastante elevada, e tem sido amplamente utilizada em diversas aplicações (50). Um exemplo de molécula utilizada para a funcionalização de AuNPs é o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), que é um hidrocarboneto linear bifuncional com um grupo tiol numa extremidade e um grupo carboxílico na outra.

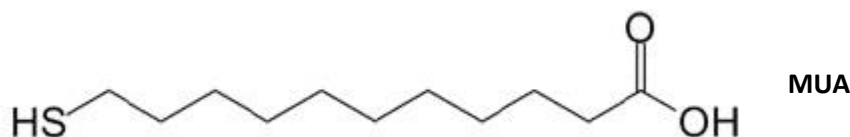


Figura 6. Estrutura química do ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA). Retirado de (140).

Um procedimento amplamente utilizado para a funcionalização de nanopartículas metálicas é a formação de superfícies *Self-Assembled Monolayer* (SAM). Estas superfícies são constituídas por uma camada organizada de moléculas que possuem

numa extremidade o chamado “grupo de cabeça”, normalmente constituído por grupos tiol, com afinidade para metais nobres, e na outra extremidade o grupo funcional terminal, que posteriormente poderá interagir com biomoléculas de interesse (51,52). Por exemplo, podem ser utilizados péptidos para formar estas superfícies de forma a conferir às nanopartículas propriedade de superfície similares às proteínas (53).

A modificação da superfície de nanopartículas metálicas é uma estratégia imprescindível para a expansão destas partículas a vários campos de investigação e aplicação, como aqueles já referenciados acima para as AuNPs.

1.6 Toxicidade das AuNPs

Com a utilização cada vez mais frequente de nanomateriais em diversas áreas, é necessário perceber qual o seu perfil toxicológico. Estudos toxicológicos já realizados sugerem que as nanopartículas podem causar efeitos adversos na saúde, mas relações diretas de causa-efeito ainda estão por definir. A interação destas partículas com sistemas biológicos como é o caso das células, é uma das áreas de investigação de maior urgência dentro da ciência de materiais, biologia e medicina (54).

No âmbito da nanotoxicologia, disciplina que junta conhecimentos da nanotecnologia e da toxicologia, são utilizados modelos biológicos como os modelos *in vitro* e *in vivo* para prever os potenciais riscos da exposição humana a nanomateriais. É ainda necessária uma avaliação dos vários fatores que podem influenciar a toxicidade destes materiais, nomeadamente as suas propriedades físico-químicas e as características específicas de cada tipo de linha celular. Estes e outros fatores influenciam a interação das nanopartículas com as células e/ou a sua internalização, que por sua vez são determinantes nos efeitos citotóxicos provocados.

1.6.1 Mecanismos de internalização de nanopartículas

Um dos aspetos mais importantes na avaliação da toxicidade das nanopartículas, nomeadamente daquelas com aplicabilidade nos produtos de consumo, é a via de internalização destes materiais nas células, bem como a extensão da mesma.

São vários os estudos que indicam diferentes mecanismos de internalização de nanopartículas pelas células, sendo o processo de endocitose, o processo mais provável de internalização de nanomateriais (55–57).

A endocitose é uma forma ativa de transporte, onde a célula sequestra o nanomaterial por via da formação de vesículas ou vacúolos na membrana citoplasmática. Este tipo de transporte engloba dois mecanismos de internalização de nanomateriais pelas células, a fagocitose e a pinocitose.

A fagocitose é o mecanismo predominante na internalização de partículas com tamanho superior a 500 nm. Este mecanismo é restrito a determinado tipo de células, como é o caso das células do sistema imunitário como os macrófagos ou monócitos (19).

A pinocitose, mecanismo que pode ser executado por todos os tipos de células, pode ocorrer por, pelo menos, quatro vias diferentes: a macropinocitose, endocitose mediada pela clatrina, endocitose mediada pela caveolina e endocitose por vias alternativas (19). Na macropinocitose formam-se saliências membranares, com mais de 1 μm , que englobam grandes porções de fluído, de uma forma não específica, que podem conter nanopartículas se estas se encontrarem nas imediações da membrana plasmática. A endocitose mediada pela clatrina ocorre em regiões específicas da membrana celular que estão enriquecidas com a proteína citosólica clatrina. Partículas com tamanhos entre 120 e 150 nm podem ser internalizadas dentro das vesículas de clatrina. Na endocitose mediada pela caveolina formam-se invaginações em forma de balão com 50-80 nm nos domínios hidrofóbicos da membrana plasmática. Além destes mecanismos dependentes da clatrina e caveolina, outros mecanismos independentes podem levar à internalização de nanomateriais pelas células (58).

Além dos mecanismos de transporte ativo mencionados, a internalização de

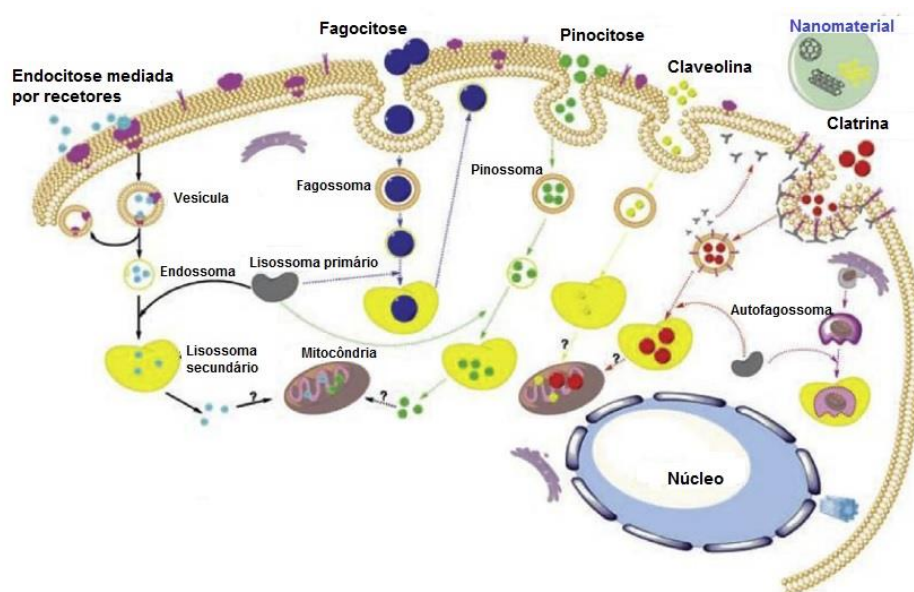


Figura 7. Representação esquemática das principais vias de internalização de nanopartículas pelas células. Adaptado de (141).

nanomateriais pelas células pode ocorrer por transporte passivo (59).

1.6.2 Mecanismos de citotoxicidade de AuNPs

O ouro é considerado inerte e biocompatível. Da mesma maneira, as AuNPs são geralmente consideradas não tóxicas (60). Apesar disso, são alguns os estudos que confirmam que as AuNPs podem provocar alguns efeitos adversos quando são captadas e se armazenam dentro das células uma vez que estas nanopartículas podem tornar-se catalisadores efetivos.

São vários os mecanismos associados à toxicidade de AuNPs. Um desses mecanismos é a interação com o ácido desoxirribonucleico (ADN), também chamado de genotoxicidade. As AuNPs podem interagir com o ADN por dois motivos principais: primeiro porque AuNPs com tamanho a rondar os 1,4 nm coincidem com o tamanho do sulco maior do ADN e segundo porque o ouro, como metal mais eletronegativo, facilmente é atraído para os sulcos do ADN que têm um ambiente negativo (61).

Outro mecanismo de toxicidade descrito para as AuNPs é a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que podem perturbar o equilíbrio entre processos antioxidantes e oxidantes que ocorrem no interior das células, ocorrendo *stress* oxidativo (62). As nanopartículas podem gerar ROS por diferentes mecanismos: degradação do revestimento ou de toda a partícula levando à libertação de iões livres, a interação com organelos celulares como a mitocôndria ou com proteínas como a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase e a interação com recetores à superfície e ativação de vias de sinalização intracelulares (63). O *stress* oxidativo causado pelas AuNPs pode ser resultado da produção de ROS diretamente pelas próprias, ou por efeitos secundários devidos à sua endocitose e interação com biomoléculas intracelulares ou organelos, que conduzem a uma resposta oxidativa por parte das células. De facto, o dano mitocondrial, muitas vezes provocado pelo *stress* oxidativo, pode levar a uma profunda alteração do funcionamento mitocondrial que constitui a principal causa de morte celular (19).

Tipos de morte celular induzidos pelas AuNPs como a apoptose e necrose têm sido descritos. A libertação de produtos tóxicos no interior da célula, quando ocorre a degradação do seu revestimento ou mesmo do metal, a destabilização da membrana celular ou em último caso a sua lise, disrupção endócrina, alteração da expressão genética e mudanças na morfologia celular, podem estar na origem da morte das células (19).

1.6.3 Estudos de toxicidade de AuNPs *in vitro*

A citotoxicidade das AuNPs tem sido objeto de uma intensa investigação, originando um número considerável de publicações. Estes estudos relatam ensaios *in vitro* desenvolvidos com diferentes linhas celulares, com AuNPs de várias formas e tamanhos, apresentando diferentes revestimentos e cargas superficiais.

A avaliação da citotoxicidade de determinadas AuNPs fornece informações muito importantes mas consideradas insuficientes quando isoladas, isto porque, não fornecem informação sobre o impacto destas nanopartículas no organismo vivo, nem refletem os seus efeitos toxicológicos sobretudo em exposições prolongadas ou crónicas. Ainda assim, os ensaios *in vitro* têm que ser bem desenhados e ponderados com todos os aspetos funcionais da AuNPs avaliados para que a interpretação dos resultados obtidos nestas condições seja o mais credível possível (64).

Existem opiniões contraditórias relativamente à toxicidade das AuNPs. Alguns investigadores, por via dos seus trabalhos com estas nanopartículas, sustentam que as AuNPs não apresentam toxicidade (64–67) enquanto outros autores demonstraram que estas nanopartículas, em determinados contextos, apresentam toxicidade (54,68–70), e que esta pode ser devida aos mecanismos de toxicidade já referidos (ver 1.7.3). Assim, estudos para avaliar a toxicidade das AuNPs evidenciaram que há vários fatores que podem influenciar a sua toxicidade, como por exemplo o tamanho, a forma, o revestimento, a concentração, entre outros (71).

Connor et al, em 2005 (65), utilizaram AuNPs esféricas com 4 nm revestidas com citrato ou cisteína, com 12 nm revestidas com glucose e com 18 nm de diâmetro revestidas por citrato, biotina e brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) para determinar a citotoxicidade na linha celular cancerígena humana de células leucémicas K562. Após 3 dias de exposição às nanopartículas de forma contínua, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Os resultados obtidos demonstraram que as AuNPs, com qualquer tamanho ou revestimento, não eram tóxicas para o modelo celular utilizado. Outro estudo (64) verificou o efeito de AuNPs esféricas com 10 nm revestidas com citrato em células dendríticas obtidas da medula óssea de ratos numa concentração em ouro de 0,5 mM. A análise da viabilidade celular destas células depois da exposição às AuNPs, demonstrou

que estas nanopartículas, mesmo em elevada concentração em ouro, não apresentavam toxicidade. Shukla et al., (70) avaliaram a citotoxicidade de AuNPs em meio aquoso em macrófagos de rato RAW 264.7. Para isso, as células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações de AuNPs (10, 25, 50 e 100 μM em ouro). A avaliação da citotoxicidade foi realizada recorrendo ao ensaio de redução do MTT. Após 48 horas de incubação as células apresentaram mais de 90% de viabilidade mesmo para a concentração mais elevada. Contudo, para essa concentração (100 μM), às 72 horas a viabilidade baixou para 85%. A diminuição da viabilidade pode, no entanto, dever-se ao *stress* celular causado pela depleção de nutrientes no mesmo meio durante as 72 horas. Estes resultados sugerem que estas nanopartículas não são citotóxicas mesmo para a concentração de 100 μM , 72 horas após exposição.

Ao contrário dos estudos anteriores, os resultados obtidos noutros estudos envolvendo AuNPs demonstraram que estas podem apresentar toxicidade, mesmo que reduzida. Outro estudo (69) avaliou a citotoxicidade de AuNPs sem qualquer tipo de revestimento específico, nas linhas celulares HepG2 (células de hepatoma humano), A549 (células de carcinoma pulmonar humano) e BHK21 (células de rim de hamster bebé), utilizando o ensaio de redução do MTT. Para todas as linhas celulares as concentrações utilizadas foram 30, 60 e 120 nM mas os tempos de incubação foram diferentes: 36 horas na linha A549 e 72 horas nas linhas HepG2 e BHK21. Os resultados indicaram que a citotoxicidade das AuNPs não é igual para as diferentes linhas celulares. Para as linhas celulares HepG2 e BHK21, as AuNPs em estudo não provocaram toxicidade enquanto, para a linha celular A549 houve resposta toxicológica dependente da concentração: quanto maior a concentração, maior a extensão de morte celular.

A dependência do tamanho no efeito de toxicidade das AuNPs é outro parâmetro já avaliado (54). AuNPs com 0,8, 1,4, 1,2, 1,8 e 15 nm revestidas com monossulfonato trifenílfosfatado (TPPMS) e de 1,4 nm revestidas com trifenílfosfato tris-sulfonado (TPPTS) foram expostas a quatro linhas celulares diferentes: SK-Mel-28 (melanoma humano), HeLa (carcinoma de cérvix humano), L929 (fibroblastos de rato) e J774A1 (macrófagos de rato). De forma a avaliar a citotoxicidade das AuNPs em cada linha celular, 48 horas após a incubação das diferentes concentrações de AuNPs, foi realizado o ensaio de redução do MTT. Neste trabalho, os resultados foram apresentados na forma de valores de IC_{50} , ou seja, a quantidade de ouro necessário para diminuir a viabilidade celular em 50%. Assim, para a linha celular HeLa, o valor de IC_{50} foi de 46 μM para as AuNPs com 1,4 nm revestidas com TPPMS, 30 μM para as AuNPs com 1,4 nm revestidas com TPPTS, 250 μM para as AuNPs com 0,8 nm revestidas com TPPMS, 140

μM para as AuNPs com 1,2 nm revestidas com TPPMS, e 230 μM para as AuNPs com 1,8 nm revestidas com TPPMS. No caso das AuNPs com 15 nm, estas não apresentaram toxicidade até à concentração de 6300 μM (concentração máxima testada). Para as outras linhas celulares, os resultados seguem a mesma tendência mostrando-se muito semelhantes aos obtidos para as células HeLa. Percebe-se assim, que no caso das AuNPs de 1,4 nm de diferentes revestimentos, estes não tiveram efeito no IC_{50} e que para todas as linhas celulares, é este o tamanho que apresenta maior toxicidade com as AuNPs de maior tamanho a serem aquelas que apresentam menor toxicidade ou mesmo toxicidade praticamente inexistente nas condições de ensaio.

O revestimento das AuNPs, é outro dos parâmetros a levar em conta na hora de determinar a toxicidade destas nanopartículas. Células Hela foram incubadas com AuNPs em forma de bastonete com 40x18 nm revestidas com CTAB, polietrólitos catiónicos nomeadamente o poli-cloreto de dialildimetilamónio (PDADMAC) e poli(hidrocloreto de alilamina) (PAH), e com um polieletrólito aniónico, o poli-4-estinenosulfonato de sódio (PSS) em concentrações em ouro de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 μM e a toxicidade destas nanopartículas avaliada 6 horas após incubação (72). A viabilidade celular foi de aproximadamente 95%, exceto para as células incubadas com os bastonetes revestidos com CTAB (79.2% de viabilidade celular) e bastonetes revestidos com PDADMAC (88.3% de viabilidade celular) para a concentração mais elevada (150 μM). Curiosamente, individualmente todos estes revestimentos, quando incubados sem AuNPs, apresentam citotoxicidade. Outro estudo (73), também utilizando AuNPs em forma de bastonete com 65x15 nm revestidos com CTAB ou com poli-(ácido acrílico, sal sódico) (PAA) avaliou a o efeito do revestimento na citotoxicidade às 24, 48, 72 e 96 horas depois de exposição das células HT-29 (células de carcinoma humano de cólon) a uma concentração de 0,4 nM em ouro. Os resultados obtidos foram de acordo aos resultados obtidos anteriormente por Hauck et al.,2008: as células incubadas com os bastonetes revestidos com CTAB foram aquelas que apresentaram maior perda da viabilidade celular, independentemente do tempo de incubação. Neste caso, a perda de viabilidade celular nas células incubadas com AuNPs em forma de bastonete revestidos com CTAB foi na ordem dos 65-75%.

Além das características das AuNPs, das concentrações e tempos de ensaio avaliados, é também preciso ter em conta o teste utilizado para avaliação da citotoxicidade. Vetten et al., (74) investigaram a citotoxicidade de AuNPs de 14 nm estabilizadas por citrato utilizando três ensaios diferentes: redução do 2,3-bis-(2-metoxi-4-

nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilido (XTT), libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e quantificação da adenosina trifosfato (ATP). Foram utilizadas duas concentrações em ouro, 1 e 5 nM, e a linha celular BEAS-2B (células do epitélio bronquial) e os ensaios realizados 1 hora após exposição das células às AuNPs. Com base nos resultados obtidos pelo teste de redução do XTT, as AuNPs na concentração de 1 nM apresentaram alguma toxicidade verificando-se um maior viabilidade celular para a concentração de 5 nM. Contudo, para as mesmas condições, com o teste de libertação da LDH, os resultados obtidos indicaram que as AuNPs utilizadas não eram tóxicas para as células. Por outro lado, os resultados de quantificação do ATP, mostraram que as AuNPs eram tóxicas para as células de forma dependente da concentração: quanto maior a concentração, menor a viabilidade celular. Os resultados contraditórios obtidos entre os ensaios realizados podem ser devidos a interferências das AuNPs, quer na leitura da absorvância (no caso dos ensaios de redução do XTT e libertação de LDH) quer no substrato utilizado (para a quantificação do ATP) o que pode interferir nos resultados obtidos.

1.7 Biocinética das AuNPs

A avaliação da cinética das AuNPs quando entram no organismo é da máxima importância. É necessário perceber como é que as AuNPs transpõem as barreiras do organismo, qual a sua biodisponibilidade, como se distribuem, se sofrem ou não metabolização e se são efetivamente excretadas.

Os estudos de biocinética são importantes para a avaliação da quantidade de nanopartículas que chegam à circulação sanguínea, após serem absorvidas, bem como para avaliação do seu perfil de biodistribuição. São ainda importantes para avaliação do perfil cinético de excreção de nanopartículas, avaliando, entre outros parâmetros, a acumulação de nanopartículas nos diferentes tecidos após exposição, até todas as nanopartículas serem eliminadas (75). Estes estudos focam-se então na avaliação da ADME.

1.7.1 Absorção de nanopartículas

O primeiro processo a avaliar nos estudos de ADME, é o processo de absorção, que representa o processo pelo qual as nanopartículas provenientes do local de administração chegam à circulação sanguínea (76). Os locais de absorção mais frequentes são os pulmões, trato gastrointestinal e a pele, dependendo do tipo de

exposição, com a absorção das nanopartículas fortemente influenciada por algumas características que estas apresentam, nomeadamente a composição, tamanho, forma, revestimento ou a carga superficial.

1.7.1.1 Absorção pulmonar de nanopartículas

Uma das vias de exposição a nanopartículas mais estudada é a exposição por via pulmonar, devido à sua presença em certos ambientes ocupacionais. A inalação constitui a via de entrada das nanopartículas no trato respiratório. Um dos principais fatores que influenciam a inalação, e subsequente absorção de nanopartículas por via pulmonar, é o tamanho da nanopartícula, pois é esta característica do material que vai determinar até onde é que a partícula penetra no trato respiratório e onde se vai depositar. Por exemplo, 90% das nanopartículas inaladas com cerca de 1 nm de tamanho depositam-se na zona nasal e da faringe, 10% na zona traqueobronquial, e praticamente nenhuma se deposita na zona alveolar. Por sua vez, nanopartículas com cerca de 5 nm depositam-se de forma equitativa pelas três zonas. Nanopartículas com cerca de 20 nm são aquelas que apresentam maior eficiência de deposição na zona alveolar (cerca de 50%) (77).

Depois de passarem os macrófagos alveolares é de esperar que as nanopartículas interajam com as células do epitélio alveolar, e cheguem ao espaço intersticial como já foi demonstrado (78). As nanopartículas passam através das células do epitélio alveolar pela via que envolve a endocitose mediada pela caveolina, e pela via que envolve a endocitose mediada pela clatrina. De salientar ainda que a translocação de partículas do epitélio alveolar para o espaço intersticial, é mais proeminente em espécies com um porte físico maior como é o caso de cães ou primatas não humanos do que em roedores como os ratos, pelo que é de esperar que este efeito ocorra também nos humanos (77).

Uma vez no espaço intersticial, depois da passagem do espaço alveolar, pode ocorrer a absorção das nanopartículas para a circulação sanguínea ou para o sistema linfático. A absorção para a circulação sanguínea é também dependente do tamanho das nanopartículas, como já foi demonstrado (77). Uma vez na circulação sanguínea, as nanopartículas podem ser distribuídas por diferentes órgãos e tecidos do organismo.

1.7.1.2 Absorção de nanopartículas via trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal representa a principal porta de entrada de nanomateriais presentes em produtos alimentares. É ainda, uma importante via de administração de fármacos que evita o desconforto associado às injeções, sendo uma via de administração

não-invasiva. Os diferentes ambientes que os nanomateriais têm que ultrapassar ao longo do trato gastrointestinal até ao intestino (local de maior absorção) e a presença de biomoléculas podem afetar as suas características físicas (25,79), sendo este fatores, fatores limitantes desta via de administração. De facto, a presença de proteínas e lípidos nas matrizes biológicas pode levar à formação de um revestimento das nanopartículas por estas moléculas, originando uma estrutura comumente chamada “*corona*”, uma estrutura instável, que pode ser removida e alterar-se durante o percurso da nanopartícula ao longo do trato gastrointestinal mas que pode afetar a absorção e reatividade da nanopartícula (25). Outra limitação desta via são as barreiras biológicas, nomeadamente o muco e o epitélio. Quando as nanopartículas ficam “presas” no muco, acabam por ser excretadas diretamente por via fecal (80).

A absorção de nanopartículas no epitélio intestinal pode ocorrer de duas formas: por via transcelular ou, em menor extensão, por via paracelular (81). Na via transcelular, o transporte de nanopartículas ocorre por endocitose que tem lugar na membrana apical da célula intestinal, e continua até ao transporte através da célula e libertação na membrana basolateral (81). Este tipo de transporte ocorre nas células M e enterócitos e depende das propriedades físico-químicas das partículas como o tamanho, potencial zeta, carga superficial ou presença de ligandos à superfície da partícula. No transporte por via paracelular, as nanopartículas passam o epitélio através do espaço intercelular (7). Este tipo de transporte é limitado, tendo em conta as condições fisiológicas e o pouco espaço entre células adjacentes (81). O transporte das AuNPs por esta via já foi demonstrado (82). Neste estudo (82), ratinhos BALB/c foram expostos durante 7 dias, através da água *ad libitum*, a AuNPs de diferentes tamanhos (4, 10, 28 e 58 nm) e revestidas com citrato, a uma concentração aproximada de 2×10^2 partes por bilião. Imediatamente após a substituição da água suplementada com AuNPs por água corrente, os animais foram sacrificados para análise por TEM do tecido intestinal. Os resultados indicaram que as AuNPs de 4 e 10 nm são absorvidas por via do transporte paracelular, ao contrário das AuNPs de maior tamanho cuja absorção não foi observada.

Além dos diferentes ambientes, das biomoléculas nas matrizes biológicas e das diferentes barreiras que as nanopartículas encontram ao longo do trato gastrointestinal, as suas características como o diâmetro, carga superficial e revestimento, também influenciam a sua absorção por esta via (83). Assim, a partir de alguns estudos realizados com diferentes tipos de nanopartículas inorgânicas, a tendência é para que quanto menor a partícula, maior a absorção pelo trato gastrointestinal (82,84), nanopartículas de carga

positiva parecem ser mais absorvidas (85,86) e, por fim, a absorção parece ser dependente da dose administrada (87,88).

Para o caso das AuNPs, um estudo realizado em 2012 (89) avaliou a absorção de AuNPs revestidas com TPPMS com 1,4, 5, 18, 80 e 200 nm após administração intra-esofágica a ratos. As doses de ouro administradas foram de 1 a 27 µg e os resultados foram todos normalizados. Os animais foram sacrificados 24 horas após a administração e foram recolhidos os órgãos, sangue, urina e fezes. Os resultados mostraram, por quantificação da radioatividade, uma maior absorção das AuNPs com 18 nm comparativamente às AuNPs com 5 nm. Os autores acreditam que estes resultados se devem à formação da *corona* nas AuNPs com 18 nm, o que aumentou a sua penetração epitelial comparativamente às outras AuNPs. Este estudo comparou ainda a absorção, no trato gastrointestinal, de AuNPs com 2,8 nm com carga superficial negativa ou positiva. As AuNPs com carga superficial negativa foram aquelas que apresentaram maior absorção (ao contrário do esperado), mas os autores acreditam que, também neste caso, proteínas presentes no trato gastrointestinal se tenham adsorvido à superfície das AuNPs com carga superficial negativa, modificando a sua carga superficial.

1.7.1.3 Absorção dérmica de nanopartículas

A pele, o maior órgão do corpo compreendendo mais de 10% da massa corporal, apresenta-se como uma barreira importante contra o ambiente externo que inclui, entre outras, funções de proteção e manutenção da homeostasia (90). Pode também ser uma via de absorção de nanopartículas, sendo a cosmética uma área onde a nanotecnologia apresenta aplicações promissoras (11).

A pele é composta por várias barreiras heterogêneas e altamente organizadas e inclui ainda folículos capilares, e glândulas sudoríparas e sebáceas. Do exterior para o interior, a pele é constituída pela epiderme, derme e hipoderme. Contudo, numa perspetiva de penetração da pele apenas se considera a epiderme e derme como sendo importantes (91). A epiderme, constituída maioritariamente por queratinócitos, consiste numa camada exterior córnea (estrato córneo), uma camada granulosa, uma camada de células espinhosas (estrato espinhoso) e uma camada de células basais (estrato basal) e atua como uma camada altamente protetora da derme (77). No estrato córneo destacam-se duas estruturas distintas, a macro e a microestrutura, que vão influenciar a entrada de nanopartículas. Na macroestrutura os queratinócitos apresentam forma hexagonal e estão dispostos numa espécie de aglomerados separados entre si por intervalos, pelos

quais, as nanopartículas podem ser absorvidas. A microestrutura é constituída por diferentes lípidos dispostos numa bicamada, onde se encontram poros ao longo da camada com tamanhos na ordem dos 0,4 a 36 nm, que poderão ser outra via de passagem de nanopartículas (92). Além destas estruturas, encontram-se ao longo da pele, folículos capilares e glândulas sudoríparas que podem atuar como via de penetração de nanopartículas (90).

A capacidade das nanopartículas ultrapassarem o estrato córneo é dependente de vários fatores (93). O modelo utilizado, o gradiente de pH que as nanopartículas encontram à medida que ocorre a sua penetração, as zonas de maior ou menor espessura da pele e a sua condição fisiológica, bem como fatores físico-químicos da nanopartícula como o tamanho, a forma e as propriedades da superfície como a carga, influenciam a absorção dérmica (92,94).

Dentro das nanopartículas inorgânicas, onde as AuNPs se inserem, a investigação sobre absorção dérmica tem-se focado nas nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio, devido ao facto de serem frequentemente utilizadas nas formulações dos protetores solares (95).

1.7.2 Biodistribuição de nanopartículas

Após o processo de absorção de nanopartículas pelas diferentes vias de entrada no organismo, a circulação sistémica pode distribuir as nanopartículas entre os órgãos e tecidos. Contudo, as nanopartículas podem, eventualmente, interagir com proteínas plasmáticas, células sanguíneas e fatores de coagulação (7,96) o que pode afetar substancialmente a sua distribuição (76).

As novas aplicações médicas utilizando AuNPs representam uma nova porta de entrada destes materiais no organismo, para além das mencionadas acima. Isto porque em muitos casos as AuNPs são injetadas diretamente no organismo, por exemplo, como agentes de contraste para imagiologia ou então como sistemas de cedência de fármacos.

O primeiro fator a levar em conta nos estudos de distribuição de nanopartículas, é a sua via de administração. Se a administração ocorrer através de inalação há uma deposição nos diferentes tecidos pulmonares, e apesar das nanopartículas sofrerem uma rápida translocação para a circulação sistémica, e daí para os diferentes órgãos, pode ocorrer uma taxa de deposição significativa, o que vai influenciar o seu perfil de biodistribuição. Num estudo, Lipka et al., em 2010 (97) demonstraram o efeito da via de exposição na distribuição de AuNPs, mas também o efeito do revestimento. Neste

estudo, a biocinética de AuNPs com 5 nm revestidas com cadeias de 750 ou 1000 Daltons de polietileno glicol (PEG) (Au-PEG 750 e Au-PEG10k, respetivamente), administradas a ratos Wistar-Kyoto fêmeas por via intravenosa ou intratraqueal, foi comparada com a biocinética de AuNPs revestidas com citrato mas com um ligando de bis(p-fenilsulfonato) (Au-Phos), que foram utilizadas como controlo. De forma a detetar as AuNPs, foi utilizado ^{198}Au . As Au-Phos apresentavam 11 nm, as Au-PEG750 21 nm, e as Au-PEG10k 31 nm. A acumulação de ouro nos órgãos e tecidos foi avaliada 1 e 24 horas depois da administração. Os animais foram mortos por exsanguinação e recolhidos os órgãos, sangue, urina e fezes. Os resultados indicaram que, às 24 horas, após a injeção intravenosa a maior parte das AuNPs encontrava-se no fígado e baço (aproximadamente 92% da dose administrada para as Au-Phos, 85% para as Au-PEG750 e 54% para Au-PEG10k), enquanto as AuNPs administradas por via intratraqueal ficaram praticamente todas retidas nos pulmões (aproximadamente 100% para os três tipos de AuNPs). Neste estudo foi ainda possível avaliar o efeito do revestimento na distribuição das AuNPs. Para a administração intravenosa, em alguns dos órgãos avaliados, nomeadamente fígado, baço e rins, registou-se uma maior distribuição das Au-Phos comparativamente às AuNPs revestidas com PEG para os dois tempos avaliados. Também os resultados para os dois tamanhos de AuNPs revestidas com PEG são diferentes. Por exemplo as Au-PEG750 foram detetadas no cérebro o que não acontece para as Au-PEG10k e Au-Phos.

O revestimento das AuNPs é outro parâmetro avaliado quando se estuda a sua biodistribuição. O efeito de cinco revestimentos diferentes foi avaliado após administração a ratos, por via intravenosa, AuNPs revestidas com citrato, 11-MUA e três pentapéptidos [CALNN (Cys-Ala-Leu-Asn-Asn), CALNS (Cys-Ala-Leu-Asn-Ser) e CALND (Cys-Ala-Leu-Asn-Asp)] (98). Trinta minutos, 2, 6 e 24 horas após administração, os animais foram sacrificados e os órgãos incluindo o coração, fígado, pulmão, baço, rim, testículos, intestino delgado, uma amostra de fémur, cérebro e cauda foram recolhidos para doseamento do ouro. Os resultados obtidos indicaram que, no caso dos animais aos quais foram administradas AuNPs revestidas com citrato, foi no fígado que se encontrou a maior quantidade de ouro, seguido pelo baço e pulmão. No fígado, os níveis de ouro mantiveram-se elevados ao longo das 24 horas representando aproximadamente 60% da quantidade total administrada, sendo que as AuNPs revestidas com 11-MUA e com os diferentes pentapéptidos, seguem a mesma tendência de distribuição das AuNPs revestidas por citrato: as maiores concentrações de ouro encontradas no fígado, seguido pela cauda, baço, e pulmões. No fígado, a maior quantidade de ouro foi detetada para as

AuNPs revestidas com CALND, enquanto no baço foram as AuNPs revestidas com 11-MUA aquelas que apresentaram maior concentração em ouro. Comparando os resultados das AuNPs revestidas com citrato com aquelas revestidas com pentapéptidos, regista-se que acumulação no fígado é muito maior para as AuNPs revestidas com pentapéptidos. Noutro estudo (99), utilizaram-se AuNPs com aproximadamente 20 nm revestidas com CALNN ou citrato para avaliar o efeito do revestimento na biodistribuição, a curto (30 minutos) e longo prazo (28 dias) após administração de uma única dose de 0,7 mg ouro/kg por injeção intravenosa a ratos. Após os tempos pré-definidos os animais foram sacrificados por exsanguinação, e o sangue, coração, fígado, pulmões, baço, rins, testículos, duodeno, porção do fémur, musculo, timo, cérebro e cauda foram recolhidos para quantificação do ouro. Trinta minutos após a injeção intravenosa, o fígado era o órgão que apresentava a maior quantidade em ouro, com aproximadamente 63% da dose administrada para as AuNPs revestidas com citrato e 52% para as AuNPs revestidas com CALNN, mas sem se registarem diferenças significativas entre os dois revestimentos em nenhum dos órgãos recolhidos. Contudo, 28 dias após injeção, registaram-se valores significativamente mais baixos no fígado, nomeadamente aproximadamente 28% da dose administrada para as AuNPs revestidas com citrato e 24% para as AuNPs revestidas com CALNN, mas sem diferenças significativas entre os dois revestimentos. Para todos os outros órgãos, registaram-se quantidades de ouro, independentemente do tempo, abaixo de 1% da dose administrada, com exceção da cauda (local de administração).

Um estudo anterior (100) avaliou também a distribuição de AuNPs revestidas com PEG de dois tamanhos diferentes, 15 e 50 nm, após administração intravenosa de 0,3 mg ouro/kg em ratos. Os animais foram sacrificados 24 horas após a injeção e a concentração de ouro nos diferentes órgãos (cérebro, rins, pulmão, fígado e baço) determinada por espectroscopia de absorção atómica. Para os dois tamanhos de AuNPs, a máxima concentração de ouro foi detetada no fígado e baço. Nestes órgãos, foi também registada uma clara distribuição dependente do tamanho: quanto maior o tamanho da partícula maior a sua acumulação. No caso do cérebro, a acumulação foi maior para as AuNPs de menor tamanho, e nos rins e pulmão a acumulação foi semelhante para os dois tamanhos. De facto, são muitos os estudos que reportam uma distribuição dependente do tamanho após administração intravenosa (101,102).

Num desses estudos, (102) para avaliar a influência do tamanho das nanopartículas na distribuição após administração por injeção intravenosa, foram utilizadas AuNPs esféricas com 10, 50, 100 e 250 nm. Vinte e quatro horas após injeção, os animais foram sacrificados e o cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, baço e os testículos foram

recolhidos para determinação do conteúdo em ouro. Os resultados mostraram que houve maior acumulação de ouro no fígado e baço, para todos os tamanhos de AuNPs administradas. Curiosamente, foi o grupo de animais aos quais foram administradas as AuNPs de 50 nm que apresentaram menor conteúdo em ouro nestes órgãos. Em contrapartida, por comparação entre todos os tamanhos e todos os órgãos, foram as AuNPs de menor tamanho, ou seja 10 nm, aquelas que mais se distribuíram ao longo do organismo.

Apesar dos estudos de avaliação da distribuição de AuNPs serem em grande número referentes à via de administração intravenosa, existem alguns estudos cuja via de administração é a via oral. Alguns destes estudos reportam uma distribuição das AuNPs dependente do tamanho (82,89). Hillyer & Albrecht, em 2001 (82), demonstraram o efeito do tamanho das AuNPs na biodistribuição após administração oral. AuNPs com 4, 10, 28 e 58 nm foram administradas *ad libitum* pela água a ratinhos, com uma concentração de 2×10^5 partes por bilhão durante 7 dias. Os animais foram sacrificados 12 horas após a substituição da água suplementada com AuNPs por água corrente e os resultados indicaram que, com a diminuição do tamanho das nanopartículas, houve um aumento na distribuição de ouro nos órgãos recolhido. As AuNPs com 58 nm não foram detetadas na maior parte dos órgãos. Os animais aos quais foram administradas as partículas com 4 nm apresentaram maior conteúdo em ouro nos rins, fígado, baço, pulmões e no cérebro. Em contrapartida, para as partículas de maior tamanho foi detetado maior conteúdo em ouro quase exclusivamente no trato gastrointestinal, apesar de corresponder a uma percentagem muito pequena da dose administrada.

A carga superficial das AuNPs é outro parâmetro que pode influenciar a sua biodistribuição. Um estudo avaliou a distribuição de AuNPs esféricas com 2,8 nm e com carga superficial oposta em ratos Wistar-Kyoto fêmeas após administração intravenosa (103). As AuNPs carregadas positivamente apresentavam à superfície ligandos de cisteamina enquanto as AuNPs carregadas negativamente apresentavam ácido tioglicólico à superfície. Vinte e quatro horas após administração, os animais foram sacrificados e os pulmões, fígado, baço, rins, cérebro, coração, útero, esôfago, estômago e intestino delgado e grosso foram recolhidos. Independentemente de terem carga positiva ou negativa, a maior parte das AuNPs administradas foram encontradas no fígado. Contudo, houve maior acumulação das AuNPs com carga negativa (81% contra 72% para as de carga positiva). Pelo contrário, no baço foram as AuNPs com carga positiva aquelas que apresentaram maior acumulação, o mesmo acontecendo para o

coração e rins. A menor acumulação de AuNPs carregadas positivamente no fígado pode explicar os resultados nos outros órgãos.

De entre os estudos de biodistribuição de nanopartículas no organismo, é possível verificar que são vários os fatores que influenciam a biodistribuição como é o caso do tamanho, carga e revestimento. A investigação nesta área é um processo complexo e multifatorial, que implica a análise de cada caso individualmente. Assim, torna-se praticamente impossível prever a biodistribuição de determinada nanopartícula sem se efetuarem os estudos apropriados, quer de caracterização físico-química, quer de biocinética *in vivo*. Contudo, tendo em conta os estudos avaliados percebe-se que tecidos com paredes epiteliais fracas, como é o caso do fígado e baço, são aqueles que apresentam maior acumulação de nanopartículas. O tamanho limitado do poro da parede endotelial atua como barreira primária que permite uma acumulação seletiva em certos tecidos. A maior acumulação nestes órgãos é também em grande parte devida à presença de macrófagos que são responsáveis pela captura de partículas e macromoléculas que circulam no sangue (75).

1.7.3 Metabolismo de nanopartículas

Estudos sobre o metabolismo de nanopartículas são praticamente inexistentes. Acredita-se, contudo, que o metabolismo depende em grande parte do tipo de nanopartícula. Nanopartículas poliméricas e lipídicas já são produzidas de forma a serem biodegradáveis. Estas podem ser degradadas no ambiente extracelular, se não tiverem a estabilidade necessária, e assim são destruídas antes de chegarem ao seu alvo. Estas partículas desagregam-se e voltam às suas unidades básicas que seguem a sua via normal de metabolização.

No caso das nanopartículas inertes, como as nanopartículas de ouro ou prata, é pouco provável que estas sejam efetivamente metabolizadas no organismo. No caso das nanopartículas funcionalizadas, acredita-se que estas sejam metabolizadas. Um exemplo são os QD funcionalizados com proteínas que podem ser clivados por proteases (104), fazendo com que o seu núcleo fique exposto ou que acabe mesmo por se desagregar. Assim, o metal exposto pode ser sequestrado pelas metalotioneínas existentes nos tecidos onde estas nanopartículas normalmente se acumulam (105). Contudo, estudos desenvolvidos até ao momento sugerem que há conservação das propriedades do revestimento mesmo a longo prazo (106,107). Neste sentido, um estudo (108) descreveu o destino de AuNPs com 40 nm revestidas com citrato depois de injetadas por via intravenosa em ratos. Os animais foram sacrificados 1 dia, 1, 3 e 6 meses após a injeção

das nanopartículas. Verificou-se que mesmo após 6 meses as AuNPs continuavam no fígado, nas células de Kupffer, armazenadas em vesículas endocíticas, havendo apenas uma diminuição de 9% na quantidade de ouro neste espaço de tempo. Quando observadas por TEM, verificou-se que vesículas endocíticas das células de Kupffer mantinham um aspeto normal.

Contudo, existe pouca informação sobre o metabolismo das nanopartículas inertes, não se sabendo se são estáveis ao ponto de, não serem degradadas durante os longos períodos de tempo em que se podem manter no organismo. Sobre a degradação do revestimento destas nanopartículas, sabe-se que pode ocorrer em alguns casos (104) mas sem se perceber qual a sua extensão.

1.7.4 Excreção de nanopartículas

Depois de absorvidas na circulação sanguínea, a excreção das nanopartículas pode ocorrer por várias vias. As mais expressivas são a excreção por via urinária e por via fecal. Acredita-se que outras vias de eliminação possíveis sejam as glândulas mamárias ou as glândulas sudoríparas, mas não existe informação concreta disponível sobre estas vias até ao momento (76).

Quando inaladas, as nanopartículas podem sofrer retenção nas vias aéreas, nomeadamente na zona da traqueia, serem movidas pelo cílios e envolvidas em muco passando para o trato gastrointestinal onde, ou são absorvidas no intestino, ou são excretadas por via fecal (77). O mesmo acontece com as nanopartículas que são administradas por via oral (80). Neste caso, genericamente, os estudos existentes apontam para uma quantidade apreciável não absorvida que é excretada pelas fezes. Há que ter em conta, no entanto, a excreção biliar de nanopartículas absorvidas e que contribuem para a excreção fecal (76).

Parâmetros como o tamanho, forma, revestimento e carga superficial podem afetar a excreção das nanopartículas, como já foi demonstrado para nanopartículas de prata (109) e óxido de zinco (87).

No referente a AuNPs, no estudo conduzido por Lipka et al. (97), já mencionado acima, foi avaliada também a excreção de AuNPs de 5 nm revestidas com cadeias de 750 ou 1000 Daltons de PEG (Au-PEG750 e Au-PEG10k, respetivamente) e AuNPs revestidas com citrato mas com um ligando de bis(p-fenilsulfonato) (Au-Phos), administradas ratos por via intravenosa ou intratraqueal. Após 1 e 24 horas da

administração, a excreção destas nanopartículas foi avaliada na urina e fezes, por doseamento do ouro. A concentração de nanopartículas Au-Phos (aquelas com menor diâmetro) aumentou significativamente na urina ao longo do tempo de estudo. A concentração em ouro, para estas partículas no início do estudo (1 hora) era $9,9 \times 10^{-4}\%$ e às 24 horas era $1,3 \times 10^{-2}\%$ da dose administrada. No caso das AuNPs revestidas com PEG, ao longo do estudo a concentração em ouro na urina diminuiu: para as Au-PEG750 e Au-PEG10k houve uma redução de cerca de 50% na excreção de ouro na urina. No caso da excreção por via fecal, os resultados apresentados são relativos às concentrações de ouro detectadas nas fezes e no trato gastrointestinal. Por esta via, apesar de todos os tipos de AuNPs apresentarem um aumento na excreção da 1 para as 24 horas, apenas as Au-PEG10k apresentaram um aumento significativo nas fezes e trato gastrointestinal (15 vezes maior para a excreção às 24 horas). Assim, parece que as AuNPs com uma cadeia PEG mais longa (Au-PEG10k) são mais excretadas nas fezes que as AuNPs com cadeias mais curtas (Au-PEG750), nas primeiras 24 horas após administração por injeção intravenosa.

Tendo em conta os estudos aqui apresentados para a avaliação da biocinética das AuNPs, nomeadamente a extensão da absorção, distribuição, metabolismo e excreção, torna-se evidente a necessidade de mais e melhores estudos. A maioria dos estudos referem-se à administração por injeção intravenosa faltando estudos relativamente às outras vias de administração. É também necessário fazer uma extensiva caracterização das AuNPs antes de qualquer ensaio, uma vez que as diferentes propriedades das nanopartículas influenciam o seu comportamento *in vivo*. Também as diferentes matrizes biológicas que as nanopartículas enfrentam ao longo do seu trajeto no organismo podem influenciar os processos de ADME. Conclui-se assim que apesar de se denotarem certas tendências para certos parâmetros como tamanho e dose, cada tipo de nanopartícula comporta-se como um material novo, sendo sempre necessário estudar cada caso em separado.

2. SECÇÃO EXPERIMENTAL

2.1 Objetivos

Com o crescimento exponencial do interesse, investigação e utilização da nanotecnologia e dos nanomateriais em produtos de consumo, surgiu a necessidade de perceber qual o seu efeito na saúde humana, nomeadamente perceber quais as características intrínsecas aos nanomateriais que afetam o seu perfil toxicológico.

Assim, o objetivo deste trabalho passou pela avaliação da citotoxicidade *in vitro* e biodistribuição *in vivo* após administração de AuNPs após a sua síntese e caracterização. Foram então sintetizadas AuNPs esféricas e em forma de estrela, forma inovadora e ainda com um número muito reduzido de estudos sobre a sua toxicidade na literatura.

No caso das AuNPs esféricas foram sintetizadas partículas com tamanhos diferentes e com dois revestimentos distintos, citrato de sódio e MUA, de forma a avaliar o efeito do revestimento e tamanho na citotoxicidade em dois tempos de incubação (4 e 24 horas) nos modelos celulares HepaRG, antes e após diferenciação celular, Caco-2 e hepatócitos primários de rato.

Foram ainda sintetizadas AuNPs em forma de estrela, cujo tamanho coincidissem com um dos tamanhos de AuNPs esféricas sintetizadas, de forma a determinar o efeito da forma na viabilidade nos tempos de incubação e modelos celulares já mencionados. Foi ainda avaliado o efeito do tamanho na citotoxicidade destas AuNPs.

De forma a determinar o efeito da forma na distribuição *in vivo* após administração oral, AuNPs esféricas e em forma de estrela com tamanhos semelhantes foram administradas a ratos e a sua distribuição avaliada 24 horas depois.

Desta forma pretende-se dar mais um passo na determinação da existência de potenciais efeitos negativos das AuNPs, ou pelo contrário constatar-se a sua biocompatibilidade, com modelos celulares e animais.

2.2 Materiais e Instrumentação

2.2.1 Síntese de AuNPs

O material de vidro utilizado nas sínteses foi previamente lavado com uma solução de água-régia (ácido nítrico/ácido clorídrico, 1:3) e de seguida enxaguado abundantemente com água ultra pura Mili-Q (18,2 MΩ.cm). Quer na síntese de AuNPs esféricas, quer na síntese de AuNPs em estrela, todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultra pura Mili-Q filtrada (18,2 MΩ.cm).

Para a síntese de AuNPs esféricas, foram preparadas soluções de ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl₄, solução a 30% (m:m) em HCl, 99,99% puro) (Sigma-Aldrich) e citrato de sódio di-hidratado (com grau de pureza de 99,99%) (Merck). Além destes reagentes, foi ainda utilizado ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (Sigma-Aldrich) para a funcionalização das AuNPs.

Depois da síntese, as suspensões de AuNPs esféricas foram filtradas usando filtros constituídos por uma membrana de polietersulfona com poro com diâmetro de 0,22 µm (PES 0,22 µm).

Para a síntese de AuNPs em forma de estrela, foram preparadas soluções HAuCl₄ (solução a 30% (m:m) em HCl, 99,99% puro), citrato de sódio di-hidratado (com grau de pureza de 99,99%), nitrato de prata (AgNO₃, com grau de pureza de 99,99%) (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico (com grau de pureza de 99,99%) (Sigma-Aldrich), hidróxido de sódio (NaOH, com grau de pureza de 99,99%) (PanReac) e MUA.

Para a centrifugação das suspensões de AuNPs em forma de estrela utilizou-se uma centrífuga *SIGMA 2-16K*.

Para a pesagem de todos os compostos usados durante a síntese das AuNPs utilizou-se uma balança Analítica Metler (2x10⁻⁵ g).

A medição das absorvâncias das diferentes amostras de AuNPs foi realizada num espectrofotómetro de UV/Vis de feixe simples *Varian Cary 50 Bio* utilizando células de quartzo (Starna) de 1 cm de percurso ótico, no intervalo 300 - 1000 nm.

As imagens de microscopia de transmissão eletrónica (TEM) foram obtidas a partir de um microscópio *HITACHI H-8100* no Departamento de Engenharia dos Materiais do Instituto Superior Técnico e posteriormente analisadas no programa de tratamento de

imagens, *ImageJ* (obtido a partir de <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foi ainda avaliada a polidispersão, o tamanho das AuNPs e o potencial zeta das mesmas recorrendo a um Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments™), com um laser a 633 nm e com o ângulo de dispersão fixado a 173°.

Para proceder à esterilização de todas as suspensões de AuNPs, estas foram filtradas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, recorrendo ao uso de filtros estéreis constituídos por uma membrana PES 0,22 µm e determinada a concentração em ouro por espectrofotometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (EAA-AE) com espectrofotómetro Analyst 600 (PerkinElmer). Para a análise da quantidade em ouro nas suspensões de AuNPs sintetizadas, foi necessário ácido clorídrico (HCl) a 37%, ácido nítrico (HNO₃) a 65% e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Merck), para a digestão das amostras. A solução modificadora de matriz usada foi preparada contendo 0,75 mL de magnésio, 1,25 mL de paládio e 35 mL de HNO₃.

2.2.2 Cultura Celular

As pesagens de todos os compostos necessários para os ensaios experimentais levados a cabo, no âmbito desta dissertação, em cultura celular, foram efetuados com balança digital (0.02-420 g) KERN_{EG} e balança analítica de precisão (1 mg – 220 g) METTLER TOLEDO AB 265-S e todos os reagentes utilizados tinham elevado grau de pureza.

O trabalho de cultura celular foi executado numa Câmara de Fluxo Laminar Telstar e as células e placas de poços mantidas em crescimento em estufa Binder CB 150 # 03-58010 e em estufa Panasonic MCO-19AIC(UV) a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Foram utilizadas placas de cultura de 96 e 12 poços (Corning® Costar®) e frascos de 75 cm³ (TPP®).

Todo o material de plástico e vidro utilizado na cultura celular era estéril ou foi previamente esterilizado por calor húmido, a 121 °C durante 2 horas, numa autoclave da marca Uniclave 88.

Para a visualização das células, quer nos frascos quer nas placas de poços, foi utilizado o Microscópio Ótico Nikon Type 119, o mesmo que foi usado para a contagem das células na Câmara de Neubauer.

Para o aquecimento dos reagentes a utilizar na cultura celular, utilizou-se o banho de água BW-05 G Lab. Companion (GFL).

Para o crescimento das células HepaRG foi usado o meio de cultura William E (Sigma-Aldrich) que contém na sua constituição L-Glutamina. O meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Gibco®), 1% da mistura penicilina (10000 U/mL)/estreptomicina (10000 µg/mL) (Invitrogen™), 1 mL de hemissuccinato de hidrocortisona (Sigma-Aldrich) 50 mM, 500 µL de insulina bovina (10 mg/mL) e 1% de anfotericina B (Fungizone®).

Para o crescimento das células Caco-2 foi usado o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (Sigma-Aldrich) que contém na sua constituição L-Glutamina, 4500 mg/L de glucose e 110mg/L de piruvato de sódio. O meio foi suplementado com 10 % de FBS (Gibco®) e 1% da mistura penicilina/estreptomicina (Invitrogen™).

Os hepatócitos primários foram mantidos em meio de cultura William E (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS (Gibco®), 2 ng/mL de insulina, 5 nM de dexametasona, 1% da solução de antibiótico, 10 µg/mL de gentamicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B (Fungizone®).

Depois de suplementados, todos os meios foram conservados a 4 °C até serem utilizados.

Para destacar as células dos frascos de cultura celular foi utilizada a solução salina HBSS (*Hanks Balance Salt Solution*) (Invitrogen™) sem cloreto de cálcio e magnésio e tripsina (0,25%) (Invitrogen™), que contém ácido etilenodiaminotetracético, sal tetrassódico (EDTA.4Na).

Para o ensaio de redução do MTT foram utilizados o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

Para o ensaio de incorporação do Vermelho Neutro (VN), foram utilizados vermelho neutro (Sigma-Aldrich) e solução de lise que consiste em 1% de ácido acético glacial numa mistura de etanol/água 1:1.

Para os dois ensaios supracitados, foi usado um agitador e para a leitura das placas foi utilizado um leitor de placas Power Wave X, Bio Tek Instruments.

No ensaio da libertação de Lactato Desidrogenase (LDH), foram utilizados tampão fosfato com KH₂PO₄, piruvato (Sigma-Aldrich) e o cofator β – NADH (Sigma-Aldrich). Para este ensaio, foi usado um leitor de placas Power Wave X, Bio Tek Instruments.

Em todos os ensaios de viabilidade celular foi utilizado Triton-X (Sigma-Aldrich) como controlo positivo.

2.2.3 Ensaaios *in vivo*

A administração oral das suspensões de AuNPs em análise foi realizada por meio de uma cânula, sendo os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas até o sacrifício. Os animais foram anestesiados com isoflurano, um éter halogenado usado para anestesia, por inalação, e sacrificados por exsanguinação.

Após remoção, os órgãos recolhidos foram lavados em soro fisiológico e retirado o excesso em papel de filtro, sendo os órgãos pesados numa balança digital (0,02-420 g) KERN_{EG}, e depois armazenados a -20 °C até análise.

A digestão ácida das amostras para quantificação do ouro nos órgãos recolhidos, foi realizada com HCl (37%), HNO₃ (65%) e H₂O₂ (Merck). A solução modificadora de matriz usada foi preparada contendo 0,75 mL de magnésio, 1,25 mL de paládio e 35 mL de HNO₃. A concentração em ouro nos diferentes órgãos foi determinada por EAA-AE num espectrofotómetro da marca Analyst 600 (PerkinElmer) equipado com um pipetador automático.

2.3 Síntese, caracterização e funcionalização das AuNPs

As AuNPs usadas neste estudo foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Química Inorgânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Ambos os tipos de AuNPs, esféricas e em forma de estrela, foram sintetizados em ambiente não estéril e posteriormente esterilizados por filtração esterilizante em ambiente asséptico.

2.3.1 Síntese de AuNPs esféricas pelo método de redução pelo citrato de sódio

A síntese das AuNPs esféricas foi baseada no método clássico de Turkevich (39) utilizando-se uma estratégia de crescimento mediado por núcleos de crescimento (48).

O método utilizado neste trabalho envolveu a inversão da ordem de adição dos reagentes, com o HAuCl₄ a ser adicionado a uma solução de citrato, sendo que o passo de crescimento foi repetido até se obterem AuNPs com os tamanhos desejados. O citrato de sódio foi usado como agente redutor e estabilizador nos diferentes passos.

Para a síntese de AuNPs esféricas com tamanho aproximado de 60 nm, colocou-se 150 mL de uma solução 2,2 mM de citrato de sódio em água miliQ filtrada num balão de síntese de 3 tubuladuras e levou-se à ebulição em banho de parafina sob agitação vigorosa. Para não haver evaporação de solvente, foi também utilizado um condensador. Quando em ebulição, adicionou-se 1 mL de HAuCl_4 25 mM, aumentando a agitação que retornou ao nível inicial após a adição do reagente. A solução foi mantida à temperatura de ebulição durante 10 minutos, após os quais baixou-se a temperatura até estabilizar nos 90 °C adicionando-se mais 1 mL de HAuCl_4 25 mM. Trinta minutos depois, procedeu-se a nova adição e a suspensão foi deixada a 90 °C durante os 30 minutos seguintes, depois dos quais a suspensão foi retirada do banho de parafina e deixada arrefecer. Neste ponto, a suspensão já apresenta cor vermelha característica das AuNPs esféricas.

Da suspensão obtida, retiraram-se 55 mL para um novo balão de síntese de 3 tubuladuras aos quais foram adicionados 53 mL de água miliQ filtrada. Mais uma vez, foi utilizado um condensador para minimizar a evaporação da suspensão. Com agitação e em banho de parafina, a temperatura da suspensão foi estabilizada nos 90 °C e foram adicionados 2 mL de citrato de sódio 60 mM e 1 mL de HAuCl_4 25 mM. Foram feitas mais 2 adições de 1 mL de HAuCl_4 25 mM a cada 30 minutos. Trinta minutos após a última adição deixou-se a suspensão arrefecer. Depois de atingida a temperatura ambiente, a suspensão foi filtrada por um filtro constituído por uma membrana PES 0.22 μm e guardada a 4°C.

Para a síntese de AuNPs esféricas de maior tamanho (cerca de 70 nm), foi ainda realizada uma nova fase de crescimento a partir da suspensão de AuNPs esféricas obtida anteriormente. Assim, retiraram-se 55 mL da suspensão anterior, para um novo balão de síntese de 3 tubuladuras aos quais foram adicionados 53 mL de água miliQ filtrada. Foi utilizado um condensador para minimizar a evaporação da suspensão. Com agitação e em banho de parafina, a temperatura da suspensão foi estabilizada nos 90 °C e foram adicionados 2 mL de citrato de sódio 60 mM e 1 mL de HAuCl_4 25 mM e a reação mantida nestas condições de temperatura e agitação durante 30 minutos, após os quais se deixou a suspensão arrefecer. Depois de atingida a temperatura ambiente, a suspensão foi filtrada por um filtro constituído por uma membrana PES 0.22 μm e guardada a 4°C.

Com um novo passo de crescimento, as diferenças macroscópicas nas duas suspensões eram evidentes (Figura 8).



Figura 8. Imagens das soluções coloidais de AuNPs resultantes do método de redução por citrato. À esquerda, a solução coloidal com AuNPs com tamanho maior apresenta-se mais turva do que a solução coloidal com AuNPs de menor tamanho, à direita.

Para além destas duas soluções coloidais de AuNPs esféricas, ao longo deste trabalho foram ainda utilizadas AuNPs com cerca de 15 nm.

Para a síntese de AuNPs com cerca de 15 nm, colocou-se 490 mL de água miliQ filtrada num balão de síntese de 3 tubuladuras, ao qual se acoplou um condensador. O balão de síntese foi então aquecido em banho de parafina até a ebulição da água e sob agitação constante. Quando atingiu a ebulição, aumentando a velocidade de agitação, foi adicionada uma solução de citrato de sódio (após a dissolução de 1,01 g de citrato de sódio em 10 mL de água miliQ filtrada). A solução foi deixada em ebulição durante 10 minutos após os quais foram adicionados 346 μ L de HAuCl_4 stock (a 1,445 M) Após 5 minutos em ebulição, retirou-se a solução coloidal do banho de parafina e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.

2.3.2 Síntese de AuNPs em forma de estrela usando uma estratégia de crescimento mediado por núcleos de crescimento

Para a síntese das AuNPs em forma de estrela, foi utilizado um método de crescimento simples (110), sem surfactante, em meio aquoso, mediado por núcleos de crescimento.

No primeiro passo, os núcleos de crescimento foram sintetizados por via da redução de ouro pelo citrato de sódio. No segundo passo, o passo de crescimento, foram

utilizados o ácido ascórbico e o nitrato de prata: o ácido ascórbico atua como agente redutor e o nitrato de prata é utilizado uma vez que a presença de íons de prata (Ag^+) é necessária para a formação das AuNPs em forma de estrela. Acredita-se que a presença de Ag^+ facilita o crescimento dos “braços” de ouro à superfície dos núcleos de crescimento de ouro produzidos pela redução de ouro pelo citrato, conferindo a forma de estrela a estas nanopartículas.

Para a solução de núcleos de crescimento de ouro (AuNPs de tamanho reduzido), 100 mL de água miliQ filtrada foi levada à ebulição num balão de 3 tubuladuras em banho de parafina, ao qual se adicionou 69,2 μL da solução *stock* de HAuCl_4 (a 1,445 M) e 15 mL de solução citrato a 1%. A solução foi então deixada à temperatura ambiente para arrefecer. À temperatura ambiente, a solução coloidal foi então centrifugada (12500 g durante 20 minutos) e armazenada a 4 °C. Antes de continuar o processo, foi feita a determinação da concentração em nanopartículas da solução de núcleos de crescimento, por espectroscopia de UV/Vis.

Para a síntese das AuNPs em forma de estrela, a 90 mL de água miliQ filtrada em agitação foram adicionados 400 μL de uma solução de HAuCl_4 50 mM, e uma mistura de 563,48 μL de solução semente 23 nM com 336,52 μL de água miliQ filtrada. Nesta fase, a suspensão apresentava um tom amarelado (proveniente da solução de HAuCl_4 50 mM). A seguir foram adicionados ao mesmo tempo, e sob maior agitação, 450 μL de ácido ascórbico 0,1 M e 900 μL de AgNO_3 0,002 M, ficando a solução com cor azul. Passados cerca de 3 minutos o pH foi ajustado a cerca de 7 usando uma solução de NaOH 1 M e foram adicionados 300 μL de MUA 10 mM.

Em seguida, o volume final de suspensão foi centrifugado a 2000 g durante 60 minutos a 25 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi retirado e foi adicionada água miliQ filtrada, para ressuspender o sedimento, até perfazer um volume final de cerca de 18 mL (Figura 9). A suspensão final foi então armazenada a 4 °C.



Figura 9. Imagem representativa das soluções coloidais de AuNPs em forma de estrela, apresentando a cor azulada característica das AuNPs com esta forma.

Foi ainda utilizada uma outra solução coloidal de AuNPs em forma de estrela, sintetizada pelo mesmo método com cerca de 60 nm de tamanho.

2.3.2.1 Determinação da concentração em nanopartículas da suspensão de núcleos de crescimento

Antes de se iniciar a fase de crescimento das AuNPs em forma de estrela, foi feita uma análise por espectroscopia de UV/Vis da suspensão núcleos de crescimento. A partir dos dados obtidos, foi calculada a concentração em nanopartículas utilizando o método de Haiss et al.,(111) e determinados os volumes a utilizar para os diferentes rácios $[\text{HAuCl}_4]/[\text{Ouro}]_{\text{núcleos de crescimento}}$. A quantidade de suspensão de núcleos de crescimento adicionada na reação depende do tamanho de AuNPs em forma de estrela que se pretende obter uma vez que, quanto menor o rácio $[\text{HAuCl}_4]/[\text{Ouro}]_{\text{núcleos de crescimento}}$, menor será o tamanho das estrelas.

2.3.3 Caracterização das suspensões de AuNPs

Após a síntese e filtração esterilizante em meio asséptico das AuNPs esféricas, revestidas por citrato de sódio, e em forma de estrela, revestidas por MUA, foram recolhidas amostras para a realização de testes de caracterização das partículas nomeadamente, espectrofotometria de absorção de UV/Vis, imagem por TEM, medições de DLS e potencial zeta, e determinação da concentração de ouro em suspensão por EAA-AE.

2.3.3.1 Espectrofotometria de absorção de UV/Vis

A espectrofotometria de absorção de UV/Vis é uma técnica utilizada na rotina de trabalho para a validação das sínteses e verificação da estabilidade coloidal das suspensões de nanopartículas.

Esta técnica é utilizada para determinar de um modo quantitativo a concentração de substâncias em solução que absorvem radiação quando expostas à radiação na zona do visível e ultravioleta, segundo a lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon c l$$

onde A representa a absorvância, ϵ representa o coeficiente de extinção molar, c a concentração e l o percurso ótico, desde que a constante ótica das nanopartículas seja conhecida (19).

Neste trabalho, as leituras dos espectros de absorção foram executadas em *cuvettes* de quartzo com 1 cm de percurso ótico e o coeficiente de extinção molar de $1,39 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. As leituras foram realizadas numa gama de comprimento de onda entre os 300 e os 1000 nm.

2.3.3.2 TEM

No TEM um feixe de eletrões monoenergético e de elevada energia é feito incidir sobre uma amostra de espessura fina, passando através dela. Com recurso a uma série de lentes, através das quais o feixe transmitido é enviado, forma-se uma imagem (112).

A partir das imagens obtidas por TEM, é possível determinar a distribuição de tamanhos e o tamanho médio das partículas com ajuda de ferramentas informáticas. Neste trabalho, foi utilizada a ferramenta informática de tratamento de imagens *ImageJ*.

Para a análise por TEM de cada amostra depositaram-se cerca de 15 μL numa rede de cobre revestida com carbono/"formvar" de 200 *mesh*, deixando-se secar à temperatura ambiente.

2.3.3.3 DLS e Potencial zeta

No decorrer deste trabalho foram ainda realizadas medidas de DLS e de potencial zeta.

O DLS é uma técnica de dispersão de luz utilizada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em suspensão. Nesta técnica, utiliza-se um laser monocromático, que ao incidir numa amostra da dispersão de nanopartículas se vai dispersar, sendo que a intensidade de dispersão da luz é detetada por um dispositivo detetor de fótons com um ângulo de dispersão fixo ou variável, e é dependente do tamanho e concentração das nanopartículas que possuem movimento aleatório, designado por movimento Browniano.

O DLS mede a intensidade do movimento Browniano das partículas e relaciona-o com o seu tamanho pela equação de Stokes-Einstein a partir da qual se determina o seu diâmetro hidrodinâmico (113,114).

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Onde $d(H)$ é o diâmetro hidrodinâmico, k a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade e D o coeficiente de difusão translacional.

É ainda possível determinar a distribuição de raios hidrodinâmicos, avaliando assim a dispersão de tamanhos das nanopartículas em suspensão.

Outra medida avaliada no decorrer deste trabalho foi o potencial zeta, que é o potencial eletrostático gerado pela acumulação de iões à superfície das partículas.

A superfície da partícula está organizada numa dupla camada elétrica composta por uma região interna, ou camada de Stern, e por uma região externa, ou camada difusa. Na primeira, os iões estão fortemente ligados à superfície enquanto que na segunda camada os iões estão ligados à superfície de um modo mais fraco, existindo ainda nesta camada uma fronteira entre os iões e as partículas que formam uma entidade estável. O potencial existente nesta camada, denominada plano deslizante, designa-se por potencial zeta (Figura 10).

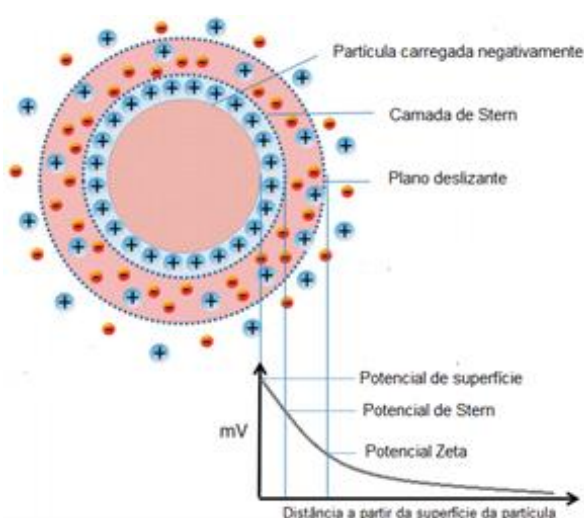


Figura 10. Representação esquemática do potencial zeta à superfície de uma partícula. Adaptado de (142).

A medição do potencial zeta é feita aplicando um campo elétrico à solução coloidal que interage com as partículas carregadas e estas são atraídas para o eletrodo de carga oposta. A velocidade da partícula no campo elétrico corresponde à mobilidade eletroforética, e que pode ser relacionada com o potencial zeta pela equação de Henry:

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta}{3 \eta} f(kR)$$

onde U_E corresponde à mobilidade eletroforética, ε corresponde à constante dielétrica e η à viscosidade do solvente, ζ é o potencial zeta e $f(KR)$ corresponde à função de Henry.

Assim, para nanopartículas, o potencial zeta mede o potencial na interface da dupla camada elétrica que se relaciona com a carga da superfície metálica da nanopartícula e também com a esfera de hidratação (agente de revestimento e líquido adjacente).

Para as medidas de DLS e potencial zeta uma amostra das suspensões de AuNPs foi transferida para uma *cuvette* apropriada, que permitisse além da medição do diâmetro hidrodinâmico a medição de potencial zeta (em poliestireno com eletrodos metálicos) (*Malvern*) sendo as leituras feitas no *Zeta Sizer Nano ZS*, com os devidos ajustes relativamente ao número de medições e temperatura para cada ensaio. Todas as medições foram realizadas em tampão fosfato 10 mM pH 7 e a voltagem utilizada para as medições de potencial zeta foi -150/+150 V.

2.3.3.4 EAA-AE

A espectroscopia de absorção atômica baseia-se na absorção de radiação eletromagnética por átomos de um determinado elemento num conjunto limitado e definido de comprimentos de onda. Como a medida é efetuada sobre átomos, estes têm que ser gerados. Assim, a produção de átomos em absorção atômica pode ocorrer por via da atomização por chama ou por atomização eletrotérmica. Dentro da espectroscopia por absorção atômica com atomização eletrotérmica encontra-se a atomização eletrotérmica em forno de grafite.

No decorrer deste trabalho, a quantificação de ouro nas suspensões de AuNPs sintetizadas foi efetuada num espectrofotómetro de absorção atómica com forno de grafite equipado com um pipetador automático. As leituras foram efetuadas no pico de absorção a 242,8 nm com uma lâmpada de cátodo oco de ouro.

Para a determinação da quantidade em ouro das suspensões de foram retirados 50 µL de cada uma das suspensões, às quais se adicionaram 5 mL de HCl 0,2% (v/v) e colocou-se na estufa a digerir, a uma temperatura de 105 °C durante um período aproximado de 5 horas. No final, diluiu-se a suspensão digerida em 10 mL de HCl 0,2% (v/v) e homogeneizou-se vigorosamente esta solução por meio de um vortex. Em seguida, retiraram-se 100 µL da solução que foram diluídos em 1 mL de HCl 0,2% (v/v), obtendo-se assim uma diluição final de 1:2000. Cerca de 1 mL desta solução foi utilizada para preencher uma *cuvette* descartável que foi colocada no amostrador automático do espectrofotómetro.

O amostrador automático foi preparado para pipetar para o interior do forno de grafite 10 µL da solução modificadora de matriz (preparada com 0,75 mL de magnésio, 1,25 mL de paládio e 35 mL de HNO₃), seguidos de 20 µL da solução a analisar. A Tabela 1 resume as condições analíticas utilizadas na análise das amostras.

Tabela 1. Condições analíticas usadas para a quantificação de ouro por EAA-AE.

Passo	Temperatura (°C)	Rampa de Temperatura (s)	Temperatura constante (s)	Fluxo do Gás (ml/min)
1 (Secagem)	110	15	25	250
2 (Secagem)	140	15	25	250
3 (Pirólise)	800	25	25	250
4 (Atomização)	1800	0	5	0
5 (Limpeza)	2450	1	3	250

2.3.4 Funcionalização das AuNPs esféricas

De forma a perceber qual o efeito do revestimento na toxicidade das AuNPs esféricas, a uma amostra das AuNPs esféricas de aproximadamente 15 nm foi trocado o

revestimento. Assim, foi utilizado MUA de forma a substituir o citrato à superfície das AuNPs.

Para substituir o citrato pelo agente de revestimento tiolado, o MUA, a um volume conhecido de partículas, este tem que ser adicionado com um número de moléculas 5000 vezes maior em relação às AuNPs de 15 nm. Como a solução de MUA estava a uma concentração de 10 mM, apenas alguns microlitros têm que ser adicionados à suspensão coloidal. Assim, após a síntese das AuNPs esféricas de aproximadamente 15 nm revestidas com citrato, calculou-se a concentração total de AuNPs existentes em solução por espectrofotometria de UV/Vis segundo o método de Haiss et al. (111), e o respetivo volume de MUA adicionar para que o número de moléculas de MUA fosse 5000 vezes superior ao número de AuNPs.

Depois da adição de MUA, a solução coloidal sofreu 3 ciclos de centrifugação (10 minutos a 18000 g)-ressuspensão em água miliQ filtrada, de forma a eliminar os possíveis excessos de agente de revestimento.

2.4 Estudos de citotoxicidade *in vitro*

2.4.1 Modelos celulares em estudo

No decorrer deste trabalho foram utilizadas diferentes modelos celulares para avaliação da citotoxicidade das suspensões de nanopartículas em estudo, nomeadamente a linha HepaRG (com as células não diferenciadas e diferenciadas) e Caco-2. Foram ainda utilizados hepatócitos primários de rato.

2.4.1.1 Células HepaRG diferenciadas e não diferenciadas

A linha celular HepaRG deriva de hepatocarcinoma humano e pode diferenciar-se em dois tipos de células quando estas atingem a confluência, um tipo em que as células apresentam forma achatada e outro que forma aglomerados de células granulares epiteliais que se assemelham a hepatócitos. A adição de 2% de DMSO e 50 μ M de hemissuccinato de hidrocortisona ao meio de cultura induz a diferenciação das células tipo-hepatócitos em mais células granulares, muito semelhantes a hepatócitos primários adultos típicos, com um ou dois núcleos, e estruturas semelhantes a canalículos biliares (115).

Esta linha celular expressa um grande número de enzimas hepáticas como é o caso das enzimas do citocromo P450 como as CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4, ao contrário de outras linhas de hepatoma como é o caso das HepG2, tornando-a muito atrativa como modelo *in vitro* para determinação do efeito de fármacos e outros compostos (115).

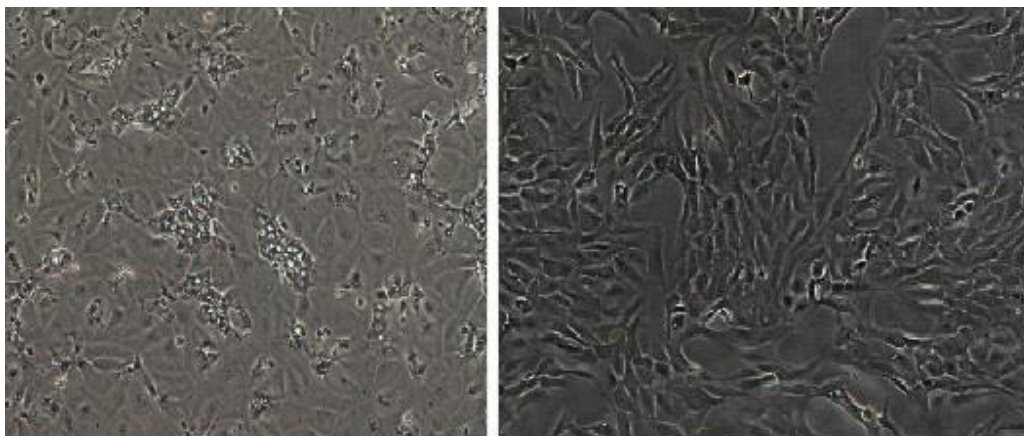


Figura 11. Fotografia das células HepaRG: à esquerda sem diferenciação e à direita após 15 dias de diferenciação em meio suplementado com 2% de DMSO.

A linha celular cresceu até à confluência em frascos de cultura T75 cm² mantidos à temperatura de 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente foi feita a tripsinização e as células semeadas em placas de 96 poços. Para ocorrer a diferenciação das células em células hepáticas, estas foram mantidas 15 dias num meio suplementado com 2% de DMSO, à temperatura de 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂, até à realização dos ensaios de toxicidade. Todos os ensaios realizados com esta linha celular, no âmbito deste trabalho, foram feitos entre as passagens P13 e P22.

2.4.1.2 Células Caco-2

A linha celular Caco-2 é proveniente de adenocarcinoma de cólon humano, e apresenta várias características morfológicas e bioquímicas semelhantes aos enterócitos do intestino delgado nomeadamente ligações intercelulares entre células adjacentes, microvilus e algumas enzimas e transportadores característicos dos enterócitos como peptidases, esterases e glicoproteína P. Estas células crescem em monocamada, apresentando morfologia polarizada cilíndrica (116).

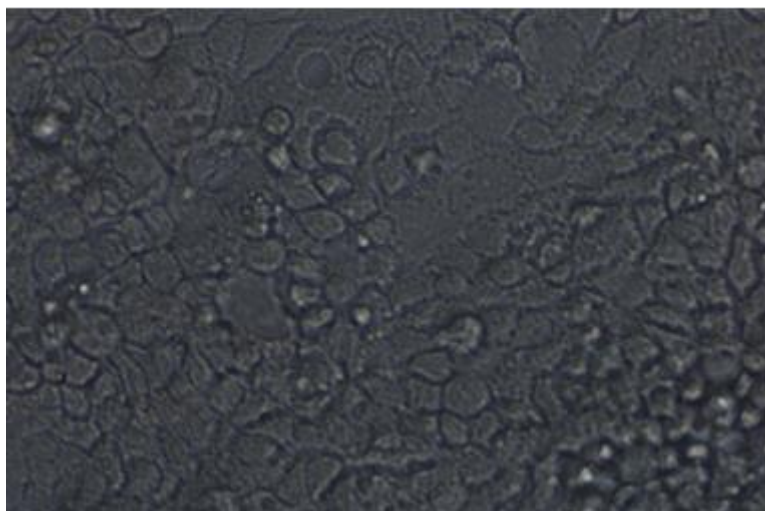


Figura 12. Fotografia das células Caco-2.

A linha celular cresceu até à confluência em frascos de cultura T75 cm² mantidos à temperatura de 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente foi feita a tripsinização e as células semeadas em placas de 96 poços em meio de cultura e incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante a noite para adesão das células aos poços. Todos os ensaios realizados com esta linha celular, no âmbito deste trabalho, foram feitos entre as passagens P75 a P79.

2.4.1.3 Hepatócitos primários de rato

Os hepatócitos primários não proliferam *in vitro* e precisam de ser isolados para cada experiência a realizar. Os ratos são a fonte mais comum de isolamento destas células, com 100 a 400 milhões de células rotineiramente isoladas de cada animal com grande taxa de viabilidade (117).

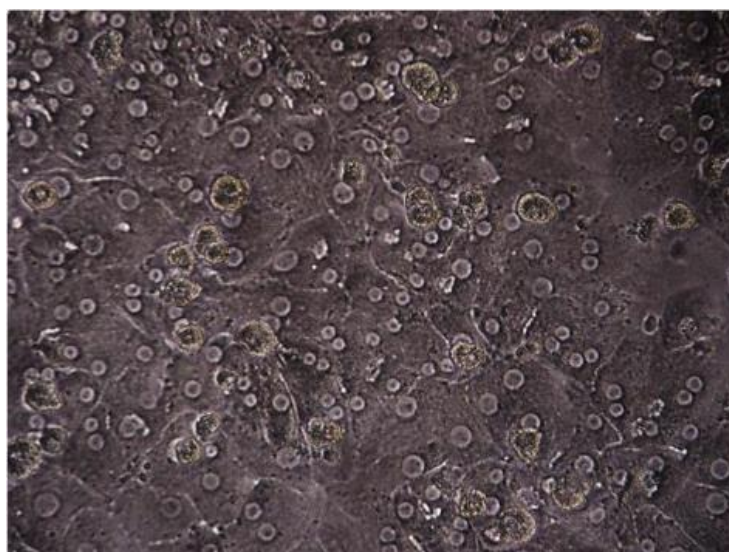


Figura 13. Fotografia dos hepatócitos primários de rato após isolamento.

Neste trabalho, o isolamento dos hepatócitos foi realizado por perfusão de colagenase de acordo com os procedimentos de rotina laboratorial do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (118).

A suspensão celular foi depois semeada em placas de 96 poços em meio de cultura e incubada a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante a noite para adesão das células aos poços.

2.4.2 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular é o parâmetro mais frequentemente avaliado nos ensaios de citotoxicidade, sendo que a viabilidade das células em cultura pode ser determinada pela monitorização de vários processos celulares, por medições baseadas em reações químicas e do metabolismo celular (16,119,120).

Para avaliar a citotoxicidade dos diferentes tipos de AuNPs utilizados nas linhas celulares supracitadas, foram utilizados dois ensaios, redução do MTT e o ensaio de incorporação do VN. Adicionalmente, na linha celular Caco-2 foi utilizado o ensaio da libertação de LDH. Estes são os ensaios mais comumente utilizados para a determinação de toxicidade ou viabilidade celular após exposição a substâncias possivelmente tóxicas (121).

Para os ensaios de viabilidade celular procedeu-se ao crescimento das linhas celulares supracitadas em placas de cultura celular de 96 poços nas quais se colocaram as células numa densidade de 50 000 células por poço para as células Caco-2, aproximadamente 150 000 células por poço para as células HepaRG diferenciadas, e não diferenciadas e 50 000 células por poço para os hepatócitos primários, num volume total de 100 µL por poço. As células foram expostas a concentrações de 1, 5, 10, 20, 40 e 60 µM de cada tipo de AuNPs e os tempos de incubação avaliados foram 4 e 24 horas. As células foram ainda expostas a 1% de Triton x-100 (controlo positivo), uma solução de 33 µM de 11-MUA e uma solução 2,2 mM de citrato de sódio (ambos usados como controlo do solvente). Para o controlo negativo, as células foram mantidas em meio de cultura durante todo o tempo de incubação.

Para cada ensaio realizado no âmbito deste trabalho, realizaram-se, pelo menos, três experiências independentes (n=3), em triplicado.

2.4.2.1 Ensaio de redução do MTT

O ensaio de redução do MTT é um ensaio colorimétrico que deteta a viabilidade mitocondrial. O MTT é um sal tetrazólio insolúvel em água, de cor amarelo pálido (120), que se converte num formazano insolúvel púrpura por clivagem do anel tetrazólio pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase quando a função das mitocôndrias não se encontra comprometida, ou seja, quando a célula não foi danificada. O formazano é impermeável às membranas celulares acumulando-se nas células viáveis (121). Contudo, é necessário dissolver este produto, uma vez que ele é apenas parcialmente solúvel no meio (120) e para isso é usada uma solução de solubilização, geralmente DMSO.

Para este ensaio, foi preparada uma solução MTT 0,5 mg/mL em HBSS na presença de cálcio e magnésio e deixada sempre ao abrigo da luz. A cada poço das placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL desta solução, após aspiração do meio de cultura que estava nos poços. As placas foram então incubadas a 37 °C na estufa durante 90 minutos para a linha celular HepaRG (diferenciada e não diferenciada), 30 minutos para a linha celular Caco-2 e 90 min para os hepatócitos primários. De seguida, a solução de MTT foi aspirada e foram adicionados 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazano formados. As placas foram deixadas em agitação durante 15 minutos ao abrigo da luz e a absorvância a 550 nm foi depois lida diretamente nas placas, usando um leitor de placas. A percentagem de viabilidade foi calculada a partir dos valores de absorção obtidos para as células expostas às diferentes concentrações e os diferentes tipos de nanopartículas, em relação aos controlos utilizados.

2.4.2.2 Ensaio de incorporação do VN

O ensaio de incorporação do VN, descrito pela primeira vez por Borenfreund & Puerner (122), permite fazer avaliação da viabilidade celular uma vez que determina a acumulação do corante vermelho neutro nos lisossomas de células viáveis (121). Nas células não viáveis o corante é libertado para o citosol, sendo libertado quando as células são expostas a uma solução de lise celular.

Para este ensaio, foi preparada uma solução de VN 50 µg/mL em HBSS na presença de cálcio e magnésio e deixada sempre ao abrigo da luz. A cada poço das placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL desta solução, após aspiração do meio de cultura que estava nos poços. As placas foram então incubadas a 37 °C na estufa durante 90 minutos para a linha celular HepaRG (diferenciada e não diferenciada), 30 minutos para a

linha celular Caco-2 e 90 minutos para os hepatócitos primários. De seguida, a solução de VN foi aspirada e foram adicionados 100 µL da solução de lise. As placas foram deixadas em agitação durante 15 minutos ao abrigo da luz e a absorvância a 540 nm foi depois lida diretamente nas placas, usando um leitor de placas. Tal como no ensaio de MTT, a percentagem de viabilidade foi calculada a partir dos valores de absorção obtidos para as células expostas às diferentes concentrações e os diferentes tipos de nanopartículas em relação aos controlos utilizados.

2.4.2.3 Ensaio de libertação de LDH

Outro ensaio habitualmente utilizado nos ensaios toxicológicos *in vitro* para determinar a viabilidade celular, baseado na integridade da membrana citoplasmática das células, é o ensaio de libertação de LDH, enzima que existe normalmente no citoplasma das células (121). A redução da viabilidade celular conduz ao aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática das células, e assim à libertação da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura celular (16).

Para o doseamento da LDH, procede-se então à medição espectrofotométrica de β-NADH consumido durante a reação de conversão de piruvato em lactato.

A partir das placas de 96 poços das culturas celulares de Caco-2, foram retirados 10 µL de meio de cada poço das células incubadas com as diferentes concentrações e diferentes tipos de nanopartículas e dos controlos (positivo, negativo e de solvente) e colocados em poços de uma nova placa de 96 poços. Posteriormente a cada poço foram adicionados 40 µL de tampão KH₂PO₄ 0,05 M e 200µL do cofator β-NADH. Depois de colocar a placa no leitor, adicionaram-se 25 µL de piruvato de sódio e iniciou-se a leitura de imediato, de forma a verificar desde logo a atividade enzimática. A leitura é feita a um comprimento de onda de 340 nm.

2.4.3 Análise estatística

Na análise estatística dos dados obtidos, utilizou-se o programa GraphPad Prism 6.0. Os resultados obtidos, de pelo menos 3 experiências independentes, foram apresentados como média ± erro padrão da média (*standard error of the mean*, SEM). A análise da distribuição dos dados (normalidade) foi avaliada recorrendo aos testes de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk e as comparações estatísticas realizadas por análise unidirecional da variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de Dunnett. Foram considerados estatisticamente significativos valores de *p* inferiores a 0,05.

2.5 Estudos *in vivo* sobre a influência da forma no perfil de biodistribuição de AuNPs

De modo a estudar a influência da forma da partícula no perfil de distribuição de AuNPs após administração oral, utilizaram-se AuNPs esféricas revestidas por citrato de sódio e em forma de estrela revestidas por MUA de tamanhos semelhantes.

2.5.1 Modelo animal e condições experimentais

O modelo animal utilizado foi o rato Wistar macho, com peso compreendido entre 350 e 450 g.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente pelos diferentes grupos experimentais, 2 animais por grupo e 1 animal para controlo.

As suspensões dos diferentes tipos de AuNPs testadas foram administradas por via oral com ajuda de uma cânula aprovada para administração orogástrica, sob anestesia ligeira, numa dose de 0,6 mg/kg de peso corporal. Para o controlo, foram administrados 2 mL de água a um animal.

Tabela 2. Volumes de suspensão de AuNPs administrados para uma dose de 0,6 mg/kg, tendo em conta o peso do animal.

Animal	Tratamento	Peso (g)	Volume administrado (mL)
#1	AuNPs Esféricas $\approx$ 60 nm	376	1,88
#2		370	1,85
#3	AuNPs Estrelas $\approx$ 50 nm (A)	400	1,47
#4		390	1,43
#5	Controlo	415	2

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas com acesso a ração e água *ad libitum*.

Após 24 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano, e sacrificados por exsanguinação, com colheita de sangue para tubos heparanizados a partir da porção

abdominal da veia cava descendente. Recolheram-se depois os órgãos/tecidos, nomeadamente o fígado, o coração, os pulmões, o baço, os rins, o esófago, o estômago (bem como o conteúdo estomacal), o intestino delgado, o intestino grosso, os testículos, uma amostra de músculo, o cérebro, uma amostra de osso (fémur), o timo e a traqueia. As amostras foram lavadas rapidamente em soro fisiológico, secas em papel de filtro e pesadas numa balança de precisão e posteriormente guardadas até serem analisadas. Foram ainda recolhidas separadamente nas gaiolas metabólicas, as fezes e urina de 24 horas de cada animal. Todos os instrumentos cirúrgicos utilizados foram cuidadosamente lavados ao longo de todo o procedimento para evitar contaminações cruzadas.

2.5.2 Determinação do conteúdo em ouro nos órgãos recolhidos por EAA-AE

O pré-tratamento das amostras biológicas foi efetuado de acordo com o protocolo descrito no trabalho de Moraes et al., 2012 (98).

Para a preparação das amostras a analisar por EAA-AE, foi praticado o mesmo protocolo já descrito para a determinação da quantidade em ouro das suspensões coloidais (ver 2.3.3.4).

3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais relativos a este trabalho serão apresentados e discutidos em consonância com os objetivos formulados. Para uma melhor compreensão dos resultados, estes serão apresentados em diferentes secções: primeiro serão apresentados os resultados relativos à síntese e caracterização dos diferentes tipos de nanopartículas sintetizadas, de seguida serão apresentados os resultados dos ensaios *in vitro* levados a cabo com os diferentes modelos celulares, e por fim serão apresentados os resultados de biodistribuição *in vivo* obtidos depois da administração oral de dois tipos de nanopartículas sintetizadas a ratos.

3.1 Síntese e caracterização das AuNPs sintetizadas

Embora existam inúmeras metodologias para a síntese de soluções coloidais de AuNPs, a mais simples e vulgarmente utilizada para a síntese de AuNPs com baixa dispersão e de forma esférica foi descrita inicialmente por Turkevich et al. em 1951 sofrendo desde então algumas modificações no sentido do seu melhoramento. Associada ao crescimento mediado por sementes, esta técnica está também na base da síntese de AuNPs de outras formas.

A síntese das AuNPs esféricas com diâmetro aproximado de 60 nm foi realizada duas vezes. A solução coloidal de AuNPs sintetizada na primeira vez, ao fim de alguns dias, acabou por perder a sua cor vermelha (Figura14).



Figura 14. Comparação entre uma solução coloidal de AuNPs macroscopicamente com bom aspeto e a solução coloidal de AuNPs que se estragou.

Já anteriormente o acondicionamento das soluções coloidais de AuNPs foi avaliado (123). Os resultados indicam que o acondicionamento em frascos de vidro se mostra mais favorável em comparação com frascos de plástico. Contudo, neste caso, na origem deste acontecimento com as AuNPs poderão estar as más condições de limpeza do frasco, requisito essencial para o bom acondicionamento e manutenção das características das AuNPs.

A síntese das AuNPs em forma de estrela foi realizada inúmeras vezes. Uma vez que é necessário que as características das AuNPs se mantenham, torna-se indispensável o controlo dos parâmetros da reação com o maior rigor possível, nomeadamente as concentrações dos reagentes, a temperatura, a adição simultânea do ácido ascórbico e nitrato de prata e o volume de síntese.

Foram testados diferentes rácios $[HAuCl_4]/[Ouro]_{\text{núcleos de crescimento}}$ determinando-se que aquele que fornecia melhores resultados, ou seja, aquele que produzia AuNPs em forma de estrela com o tamanho pretendido, era o rácio 1,2. De notar que, quanto menor o rácio utilizado, menor será o tamanho das AuNPs em forma de estrela.

As soluções de nitrato de prata e ácido ascórbico foram sempre preparadas de novo, e mantidas ao abrigo da luz, antes de cada uma das sínteses para garantir as suas boas condições uma vez que estas soluções são fotossensíveis. A adição destes dois reagentes ao sistema reacional deve ser feita em simultâneo e de uma forma célere (110). A adição de ácido ascórbico de forma lenta, faz com que não se formem AuNPs em forma de estrela, o mesmo acontecendo se este for adicionado antes do nitrato de prata. Se o nitrato de prata for adicionado antes do ácido ascórbico, este precipita e não se formam AuNPs em forma de estrela quando se adicionar o ácido ascórbico.

Para o mesmo rácio de $[HAuCl_4]/[Ouro]_{\text{núcleos de crescimento}}$ foram ainda testados dois volumes reacionais, nomeadamente 30 e 90 mL, mas manteve-se sempre as concentrações dos reagentes utilizados em ambos os casos. Os resultados obtidos, nomeadamente o tamanho e distribuição de tamanhos das partículas, por comparação das imagens de TEM de amostras de ambos os casos, foram melhores para o maior volume reacional (dados não apresentados).

3.1.1 Caracterização por espectrofotometria de UV/Vis

A caracterização por espectrofotometria de UV/Vis é uma ferramenta recorrente para a validação das sínteses e verificação da estabilidade coloidal das AuNPs sintetizadas.

A caracterização das AuNPs esféricas por UV/Vis foi realizada imediatamente após a sua síntese. No caso das AuNPs revestidas com MUA, a caracterização por UV/Vís foi realizada apenas após a funcionalização. As dispersões coloidais de AuNPs esféricas deverão apresentar um máximo de absorção a rondar os 520 nm sob a forma de uma banda plasmónica de ressonância bem definida. O deslocamento da posição da banda plasmónica pode significar a formação de partículas de maior dimensão ou de agregados.

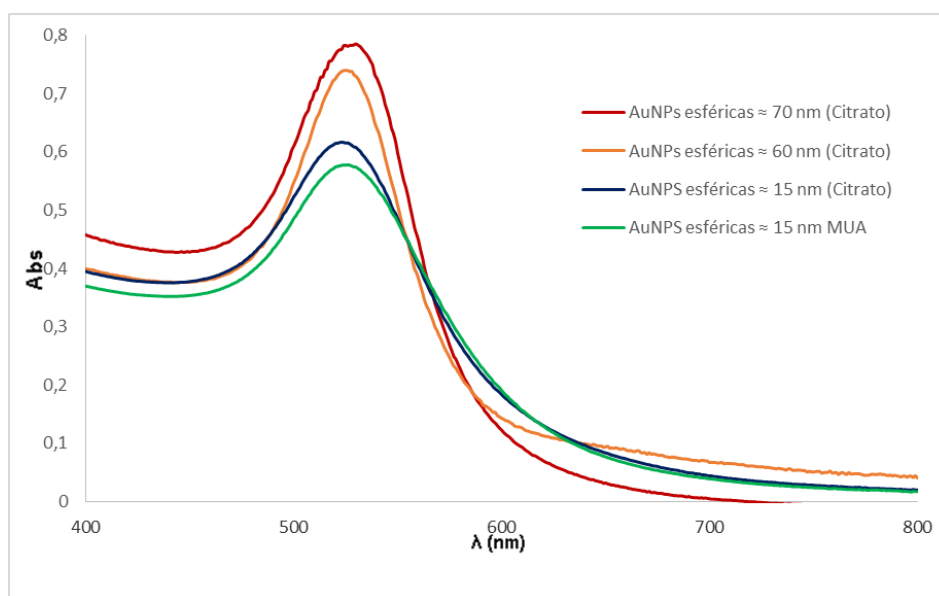


Figura 15. Espectros de absorção de UV/Vis das AuNPs esféricas.

Por observação dos espectros de UV/Vis (Figura 15) obtidos constata-se houve formação de AuNPs esféricas, uma vez que os espectros apresentam a banda plasmónica, a rondar os 520 nm. Assim, o máximo de absorção foi de 530 nm para as AuNPs de maior tamanho, 525 nm para as AuNPs com aproximadamente 60 nm e 523 e 526 nm para as AuNPs mais pequenas revestidas com citrato ou MUA, respetivamente. Constata-se ainda, pela forma da banda, que se tratam de amostras com dispersão bastante reduzida e bem estabilizadas pelo agente de revestimento, especialmente a solução de AuNPs de maior tamanho, uma vez que apresenta a banda menos larga.

No caso das AuNPs em forma de estrela, a análise por espectroscopia de UV/Vis foi realizada logo a seguir à síntese, depois das centrifugações das suspensões coloidais sintetizadas (Figura 16).

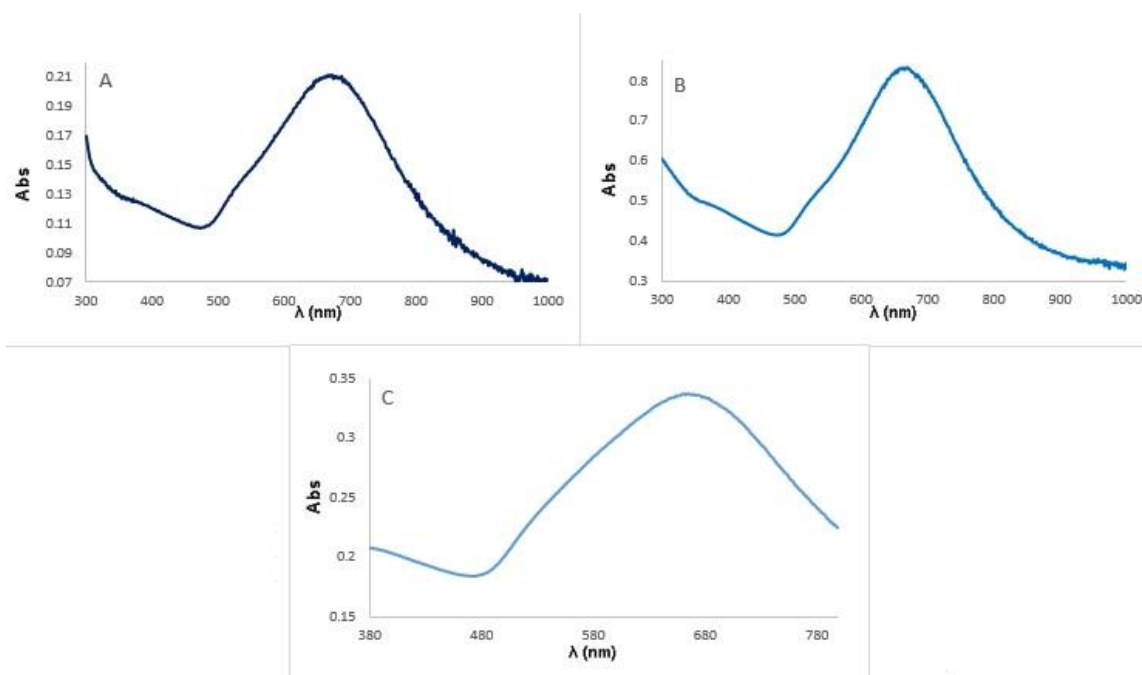


Figura 16. Espectros de absorção de UV/Vis das AuNPs em forma de estrela sintetizadas neste trabalho. Os espectros A e B correspondem às soluções coloidais sintetizadas com rácio 1,2 e o espectro C às AuNPs em forma de estrela com diâmetro maior.

As AuNPs anisotrópicas apresentam normalmente mais do que uma banda plasmónica (37). No caso das AuNPs em forma de estrela, estas apresentam duas bandas de absorção resultante da hibridação da excitação coletiva dos eletrões do núcleo da partícula e de cada ponta individual.

A relação entre o comprimento de onda da banda plasmónica e o número de pontas que as AuNPs apresentam já foi determinada (124). Assim, a banda plasmónica sofre um desvio para comprimentos de onda maiores com o aumento do número e razão de aspeto das pontas das AuNPs em forma de estrela.

Os espectros de absorção de UV/Vis das AuNPs em estrela sintetizadas apresentam uma banda entre os 650 e os 700 nm correspondente à banda de absorção das pontas (673, 670 e 662 nm para as AuNPs dos espectros A, B e C, respetivamente). Apresentam, ainda que muito ténue, uma segunda banda próxima dos 550 nm correspondente à banda de absorção do núcleo. Contudo, devido à dispersão de tamanhos das AuNPs em estrela sintetizadas, refletida pela largura da banda entre os 650 e os 700 nm, deu-se a sobreposição das bandas, tornando a sua perceção muito

dificultada. A sua percepção é ainda mais difícil para o espectro C onde a largura sugere que haja uma dispersão dos tamanhos das AuNPs considerável.

3.1.2 Caracterização por TEM

As imagens obtidas por TEM, foram analisadas num *software* de análise de imagem usado para a contagem de nanopartículas e respetivos diâmetros, o *ImageJ*. A cada amostra analisada está associado um histograma com a distribuição de tamanhos (Figuras 17-18).

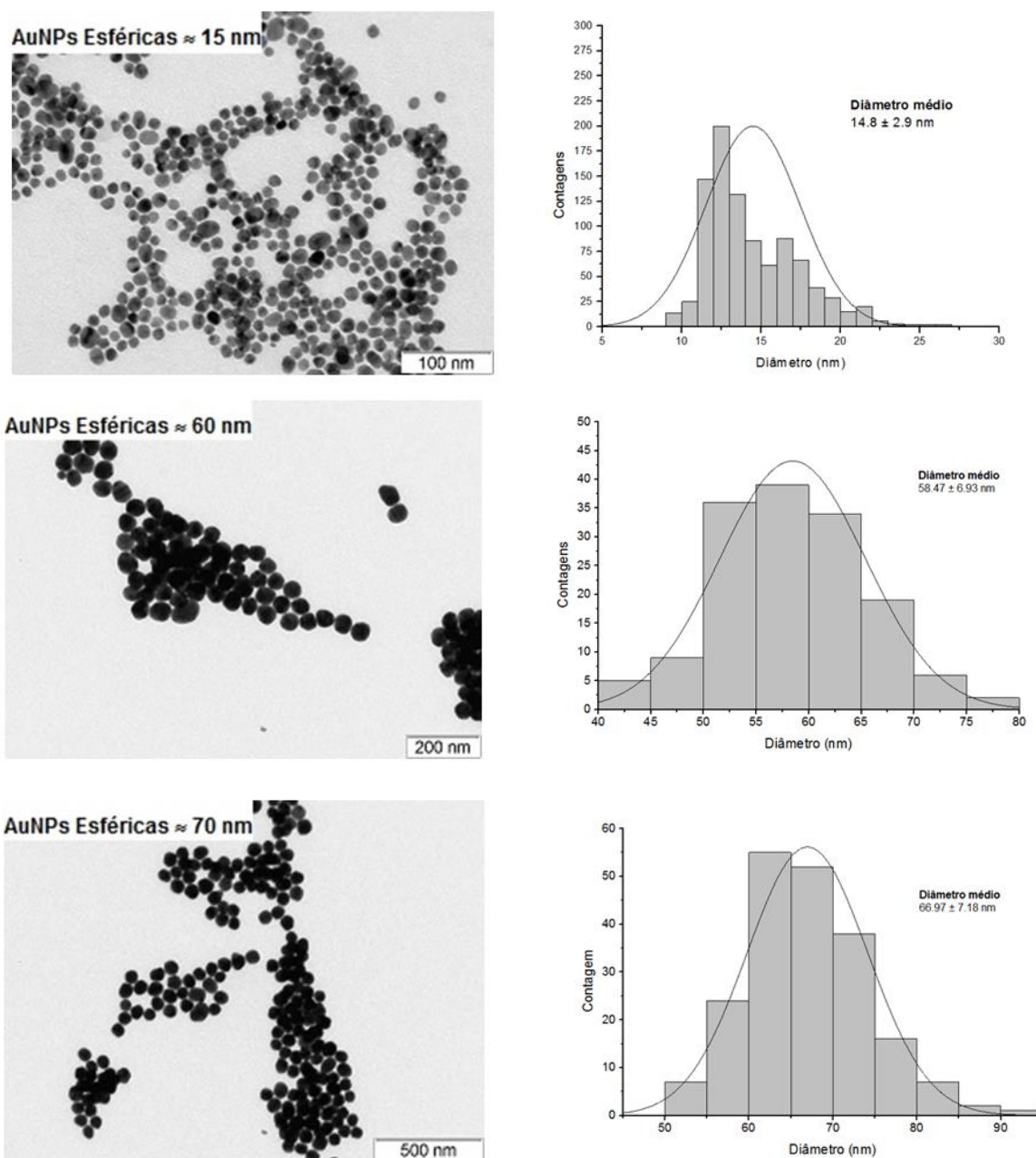


Figura 17. Imagens de TEM representativas das amostras de AuNPs esféricas e respetivos histogramas de distribuição de tamanhos.

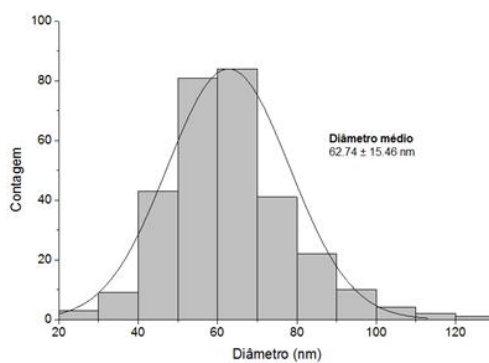
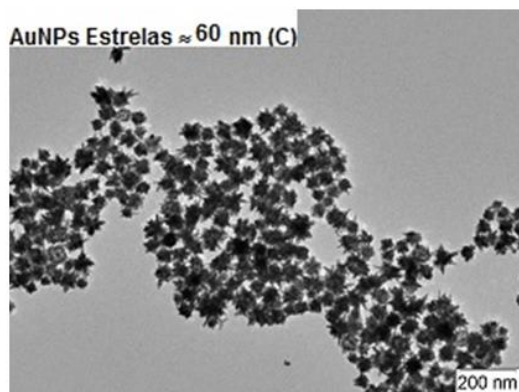
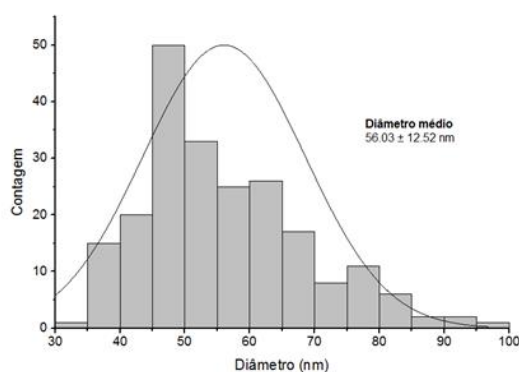
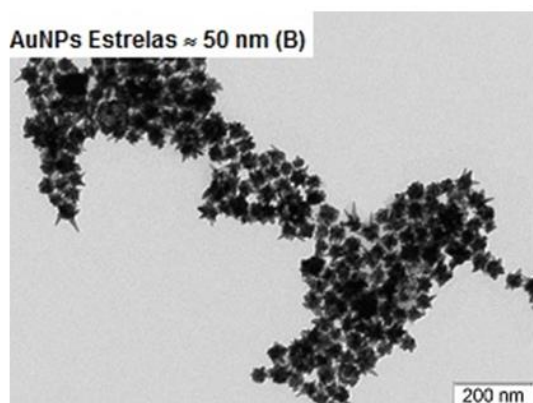
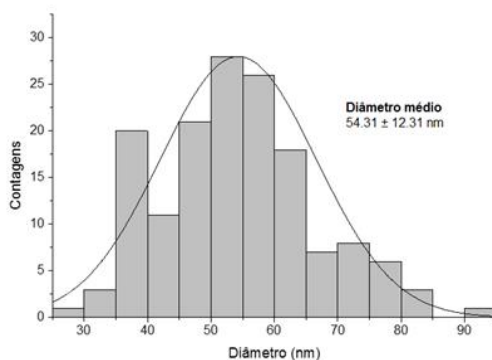
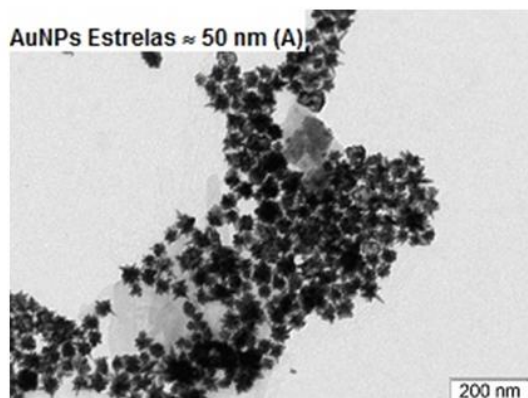


Figura 18. Imagens de TEM representativas das amostras de AuNPs em forma de estrela e respectivos histogramas de distribuição de tamanhos.

A partir das imagens obtidas, verificou-se que, efetivamente, as AuNPs sintetizadas exibiam forma esférica ou forma de estrela, consoante o método de síntese utilizado, tal como indicado pela análise espectrofotométrica. Relativamente à polidispersão de

tamanhos, verifica-se que esta é menor para as soluções coloidais de AuNPs esféricas, uma vez que estas são aqueles que apresentam menor desvio associado à medição.

De referir que todos os ensaios de caracterização das AuNPs, com exceção da avaliação por espectrofotometria de UV/Vis, foram realizados a partir de uma amostra de cada uma das suspensões coloidais depois da sua filtração esterilizante em ambiente asséptico. No âmbito da caracterização de nanopartículas é também usual recorrer-se adicionalmente a medições de dispersão de luz, nomeadamente DLS que, de certa forma, servem de complemento para uma caracterização mais completa.

3.1.3 Caracterização por medições de dispersão de luz (diâmetro hidrodinâmico) e potencial zeta

Os resultados relativos ao diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, foram obtidos a partir de 3 leituras efetuadas com cada uma das amostras das suspensões coloidais. Os valores apresentados, quer para o raio hidrodinâmico quer para o potencial zeta, foram obtidos calculando-se a média dos resultados obtidos nas três leituras.

Quando analisados os valores obtidos (Tabela 3), nomeadamente das AuNPs esféricas de menor tamanho, percebe-se que a funcionalização aumentou o seu diâmetro hidrodinâmico evidenciando que de facto ocorreu a troca de agentes e revestimento, com a substituição do citrato por MUA.

Relativamente à dispersão de tamanhos, analisando os gráficos de intensidade obtidos para a determinação do diâmetro hidrodinâmico (Anexo 1) conclui-se que, relativamente às AuNPs esféricas, a dispersão é maior para as AuNPs de menor tamanho (≈ 15 nm). No caso das AuNPs esféricas com diâmetro aproximadamente 15 nm revestida com citrato [AuNPs esféricas ≈ 15 nm (Citrato)], a existência de uma banda deslocada para tamanhos maiores pode indicar a formação de agregados. Com a mudança de revestimento/funcionalização com MUA parece ter havido um aumento da dispersão de tamanhos, mantendo-se a segunda banda de para tamanhos maiores, correspondendo provavelmente à formação de agregados. No caso das outras suspensões coloidais, os gráficos de intensidade obtidos mostram apenas uma banda.

De forma a conhecer o potencial elétrico de superfície das AuNPs, realizaram-se medições de potencial zeta, grandeza que diz respeito à carga da interface dupla camada elétrica (agente de revestimento e hidratação), sendo que os valores obtidos estão de acordo com os valores apresentados na literatura (125).

Pode-se ainda comparar os valores de potencial zeta obtidos com a mudança do agente de revestimento sendo que, uma vez que o citrato e o MUA têm cargas negativas a pH 7, não é de esperar que haja alterações significativas no valor de potencial zeta. De facto, a troca do agente de revestimento, de citrato para MUA para as AuNPs esféricas ≈ 15 nm, parece não ter grande efeito no valor de potencial zeta (Tabela 3), registando-se uma diminuição de apenas 4 mV no valor de potencial zeta quando ocorre a troca do agente de revestimento, de citrato para MUA, o que vai de encontro e estudos feitos anteriormente (126).

Quando comparados os valores obtidos por DLS com os valores obtidos pelos histogramas, verifica-se que há uma diferença relativamente aos valores determinados a partir das imagens de TEM (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de diâmetro obtidos por TEM, DLS e potencial zeta das AuNPs utilizadas no decorrer deste trabalho. Os valores são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.

	Diâmetro (TEM)	Diâmetro hidrodinâmico (DLS)	Potencial Zeta
<i>AuNPs Esféricas ≈ 15 nm (Citrato)</i>	$14,8 \pm 2,9$ nm	$43,65 \pm 1,69$ nm	-23,63 mV
<i>AuNPs Esféricas ≈ 15 nm (MUA)</i>	$14,8 \pm 2,9$ nm*	$46,72 \pm 0,76$ nm	-27,73 mV
<i>AuNPs Esféricas ≈ 60 nm (Citrato)</i>	$58,47 \pm 6,93$ nm	$59,19 \pm 0,27$ nm	-30,23 mV
<i>AuNPs Esféricas ≈ 70 nm (Citrato)</i>	$66,97 \pm 7,18$ nm	$62,73 \pm 1,27$ nm	-26,10 mV
<i>AuNPs Estrelas ≈ 50 nm (A)</i>	$54,31 \pm 12,31$ nm	$71,31 \pm 0,99$ nm	-43,53 mV
<i>AuNPs Estrelas ≈ 50 nm (B)</i>	$56,03 \pm 12,52$ nm	$59,73 \pm 0,19$ nm	-41,13 mV
<i>AuNPs Estrelas ≈ 60 nm (C)</i>	$62,74 \pm 15,46$ nm	$87,52 \pm 0,99$ nm	-33,03 mV

*O valor apresentado corresponde ao valor das AuNPs Esféricas de ≈ 15 nm antes da troca revestimento, ou seja às AuNPs Esféricas de ≈ 15 nm revestidas a citrato, uma vez que o agente de revestimento não é detetado por TEM.

Regra geral, os valores do diâmetro obtidos por DLS são superiores ao diâmetro determinado por TEM, facto justificado pelo facto da DLS ser uma técnica que mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas, que inclui necessariamente o raio da esfera de hidratação, enquanto o TEM apenas reconhece a matéria com elevada densidade

eletrônica não distinguindo a matéria orgânica, ou seja, esta técnica só deteta os núcleos inorgânicos.

Tal como esperado, para as soluções coloidais analisadas, o diâmetro médio determinado por DLS é maior que o diâmetro determinado por TEM (Tabela 3). Há contudo, em alguns casos, uma discrepância de valores obtidos entre as duas técnicas. Estas discrepâncias podem ser explicadas pelo facto das medições de DLS serem muito sensíveis à agregação, mesmo para agregados de pequena dimensão, como já foi observado anteriormente (127). Assim, a existência de agregados pode desviar toda a população de tamanhos para valores um pouco maiores.

Analisando os gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs que apresentam uma elevada discrepância entre os resultados de TEM e de DLS (Anexo 1), verifica-se que, no caso das AuNPs esféricas ≈ 15 nm, há efetivamente duas bandas de intensidade, sendo que uma é deslocada para valores muito maiores. No caso das AuNPs em forma de estrela, apesar de não se detetar uma segunda banda de intensidades deslocada para valores de diâmetro superiores, é de possível que os agregados formados tenham um tamanho relativamente pequeno, não sendo a DLS capaz de diferenciar entre as duas populações de tamanhos, pelo que as duas estão representadas numa só banda.

Surpreendentemente, e ao contrário do que seria de esperar, no caso das AuNPs Esféricas ≈ 70 nm, o diâmetro médio determinado a partir do TEM é maior comparativamente ao obtido por DLS (Tabela 3). Este resultado expõe a fragilidade associada às medições a partir de imagem obtidas por TEM. A subjetividade do operador bem como a incerteza das imagens serem representativas da solução coloidal, são fontes de incongruências. Neste caso, seria prudente uma nova avaliação por TEM, agitando bem a amostra de forma a garantir que se obtém uma alíquota representativa para avaliação por TEM. Havia contudo a possibilidade de, ao longo do tempo, ocorrerem modificações das características das AuNPs, nomeadamente a possibilidade de formação de agregados, o que influenciaria os resultados. A avaliação da estabilidade das AuNPs ao longo do tempo em que decorreu este trabalho, não foi realizada.

A partir destes resultados, denota-se a necessidade de caracterizar as nanopartículas extensivamente recorrendo a vários métodos e ensaios, sendo também do maior interesse para trabalhos futuros, a implementação de uma metodologia de trabalho, que apesar da necessidade de se adequar ao tipo de nanopartícula em estudo, seja o mais padronizada e completa possível, para a obtenção de melhores resultados.

3.2 Avaliação da citotoxicidade das AuNPs

A viabilidade celular é o parâmetro mais comumente investigado para avaliar a citotoxicidade de uma determinada substância (119).

Os ensaios utilizados durante este trabalho, redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), incorporação de vermelho neutro (VN) e liberação de lactado desidrogenase (LDH), são dos mais vulgarmente utilizados para avaliação da citotoxicidade de nanomateriais. A caracterização das nanopartículas é um requisito indispensável antes da realização destes ensaios uma vez que as nanopartículas podem interagir com os componentes dos diferentes ensaios ou interferir com os sistemas de detecção levando à obtenção de resultados pouco fidedignos (119).

Quando se testam nanopartículas, é importante não esquecer que os protocolos utilizados para a determinação da viabilidade celular variam entre grupos de investigação. Por exemplo, no ensaio de MTT, procedeu-se na parte final do ensaio à solubilização das células e do formazano com a utilização de um solvente como o DMSO, e quando se testam nanopartículas, esta solubilização dá origem a uma suspensão que contém, além do formazano dissolvido, detritos celulares. Alguns grupos, antes de fazer a leitura de absorvância, optam por centrifugar a amostra e transferir o sobrenadante para uma nova placa de 96 poços, de forma a reduzir as interferências que podem ocorrer devido aos detritos celulares (16). Durante o presente trabalho, após a solubilização das células e formazano não se efetuou a centrifugação da amostra, contudo, de forma a garantir que todo o formazano era dissolvido, as placas foram sujeitas a agitação moderada durante 15 minutos antes da leitura de absorvância.

Outro fator que deve ser levado em conta quando se avalia o efeito de nanopartículas na viabilidade celular por ensaios como o MTT e VN, que se baseiam na leitura de absorvância, é o valor de absorvância das próprias AuNPs que se pode situar no mesmo comprimento de onda daqueles utilizados para as leituras do ensaio de MTT e VN (550 e 540 nm, respetivamente). Esta interferência, que poderá levar a uma sobrestimação da viabilidade celular, pode ser controlada pela subtração da absorvância das células na presença das nanopartículas mas sem a presença dos reagentes do ensaio (ensaio em branco). Em estudos anteriores, com AuNPs esféricas ou em forma de bastonete sem revestimento ou revestidas com PEG (128) e AuNPs esféricas revestidas com citrato ou MUA (123) constatou-se que os valores de absorvância das AuNPs no comprimento de onda de 550 nm eram desprezáveis, e que, por isso, podiam ser

ignorados para efeitos de cálculo de viabilidade celular, sem correr o risco de sobrevalorizar a viabilidade das células incubadas com as AuNPs, pelo que esses resultados foram assumidos para este trabalho.

Além da interferência acima mencionada, o facto de as nanopartículas terem uma grande área de superfície aumenta a sua capacidade em adsorver outras substâncias que estejam em contacto com elas. Partindo desde pressuposto, por exemplo no caso do ensaio de redução do MTT, as AuNPs utilizadas neste trabalho poderiam adsorver na sua superfície o formazano formado, subtraindo-o do extrato celular, contribuindo para a subestimação da viabilidade celular. Esta situação é difícil de controlar, pelo que devem ser utilizados mais do que um ensaio para determinação da viabilidade celular de forma a obter resultados o mais fidedignos possível (16,119). Neste contexto, durante este trabalho, além da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT, foram ainda realizados o ensaio do VN e LDH (no caso da linha celular Caco-2). Adicionalmente, a preparação das soluções das diferentes concentrações dos diferentes tipos da AuNPs em meio suplementado com FBS, que dispersa as nanopartículas, conduz ao revestimento das mesmas com proteínas, o que pode de certo modo reduzir a interferência da adsorção na superfície da nanopartícula (16,129).

3.2.1 Avaliação da viabilidade celular após incubação com as AuNPs

As células HepaRG (diferenciadas e não diferenciadas), Caco-2 e os hepatócitos primários de rato foram incubados com soluções de diferentes concentrações dos diferentes tipos de AuNPs. Foram ainda incubadas com soluções dos diferentes agentes de revestimento. As concentrações utilizadas para as AuNPs foram 1, 5, 10, 20, 40 e 60 μM e para os controlos de veículo (agentes de revestimento) 33 μM para o MUA e 2,2 mM para o citrato de sódio por se considerarem estas concentrações representativas da concentração de agente de revestimento presente nas suspensões coloidais. Para cada tipo de AuNP e para cada linha celular, os ensaios do MTT e VN foram realizados 4 e 24 horas após a incubação. Em relação ao ensaio de LDH os tempos de incubação foram os mesmos, bem como os tipos de AuNPs testados, contudo este ensaio foi apenas realizado para a linha celular Caco-2.

Os resultados de viabilidade celular foram calculados e expressos percentualmente em relação aos valores obtidos para as células controlo (viabilidade celular % controlo) e estão representados nas Figuras 19-23 com as seguintes significâncias: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. No anexo 2 estão os valores de viabilidade celular para todas as linhas celulares incubadas com AuNPs durante 4 e 24 horas.

3.2.1.1 Ensaios de citotoxicidade em células HepaRG não-diferenciadas após incubação com as AuNPs

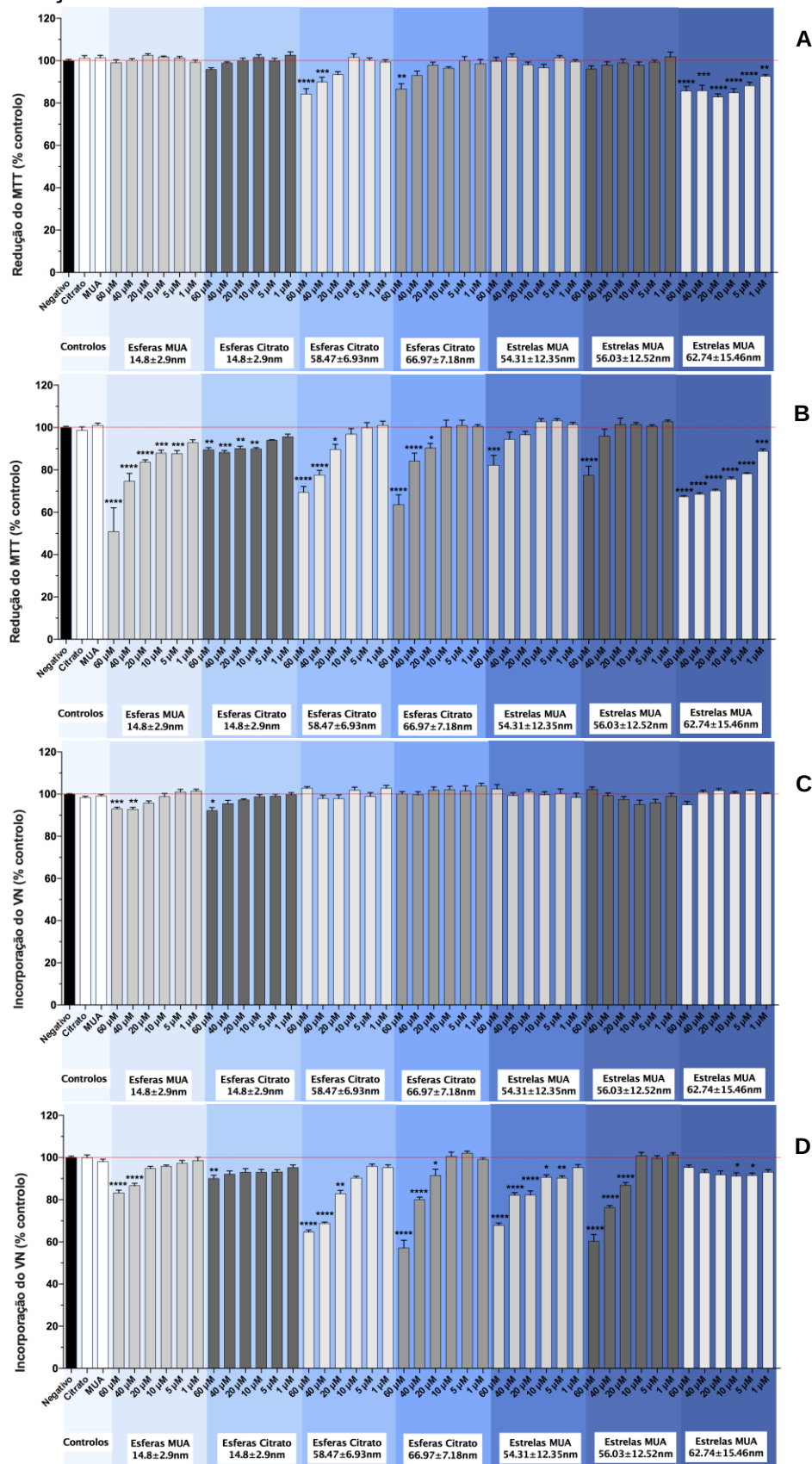


Figura 19. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nas células HepaRG não diferenciadas, pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D).

Da análise e interpretação dos resultados relativos aos ensaios de MTT e VN realizados em células HepaRG não diferenciadas (Figura 19) verificou-se que o perfil toxicológico das AuNPs testadas difere consideravelmente para os diferentes tempos de incubação.

No ensaio de MTT, às 24 horas de incubação (Figura 19B) registou-se uma tendência para menor viabilidade celular, que se torna significativa para as concentrações mais elevadas. Foram exceção as células incubadas com AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA, para as quais se observaram valores de viabilidade celular significativamente diminuídos para as todas as concentrações, e células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com citrato para as quais não se observou diminuição da viabilidade celular. Nas células cuja exposição a AuNPs levou à diminuição da viabilidade celular, para a concentração de $60 \mu\text{M}$ observou-se diminuição de aproximadamente 49% para as células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com MUA, 36% com AuNPs esféricas com $66,97 \pm 7,18$ nm revestidas com citrato, 33% com AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA, 31% com AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas com citrato, 24% com AuNPs em forma de estrela com $56,03 \pm 12,52$ nm revestidas com MUA e 18% com AuNPs em forma de estrela com $54,31 \pm 12,31$ nm revestidas com MUA. Para as 4 horas de incubação, apesar de se terem registado pequenos decréscimos de viabilidade celular com significado estatístico, a sua magnitude aponta para ausência de uma relevância biológica dos mesmos.

A tendência verificada no ensaio de redução do MTT foi confirmada no ensaio de incorporação do VN, não se registando decréscimos de viabilidade celular para as 4 horas de incubação (Figura 19C). Para as 24 horas, registou-se uma tendência para menor viabilidade com o aumento da concentração para as células incubadas com AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm e $66,97 \pm 7,18$ nm revestidas com citrato e para as células incubadas com AuNPs em forma de estrela com $56,03 \pm 12,52$ nm e $54,31 \pm 12,31$ nm revestidas com MUA, com essa tendência a tornar-se significativa para as concentrações mais altas. Contudo, no ensaio de incorporação do VN, as AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA apresentaram um perfil de citotoxicidade diferente daquele apresentado no ensaio de redução do MTT nos dois tempos de incubação. Uma vez que estes ensaios têm como fundamento mecanismos diferentes, estes resultados podem ser devidos a diferentes mecanismos de toxicidade exercidos pelas AuNPs, cuja deteção é possível por um ensaio mas não por outro. Nesta situação, onde os resultados se mostram contraditórios será de maior interesse a

determinação dos mecanismos de toxicidade destas AuNPs, estudos esses que não foram realizados no âmbito deste trabalho. Fica patente a importância de se fazer mais do que um ensaio avaliação da citotoxicidade de AuNPs de forma a obter resultados fidedignos.

Foram ainda comparados os efeitos dos revestimentos, formas e tamanhos das AuNPs na viabilidade celular das células HepaRG não-diferenciadas registrados no ensaio de redução do MTT às 24 horas de incubação (Figura 19B). Considerando os valores de viabilidade celular das células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm com os diferentes revestimentos, citrato ou MUA, apenas se registou um decréscimo significativo de aproximadamente 38% para as células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com MUA relativamente às revestidas com citrato para a concentração de 60 μ M. Registou-se também a tendência de maior toxicidade por parte das AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com MUA para as concentrações menores.

Considerando a forma das AuNPs incubadas no efeito da viabilidade celular nas células HepaRG não-diferenciadas, AuNPs esféricas e em forma de estrela de tamanhos semelhantes (como é o caso das AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas a citrato e as AuNPs em forma de estrela com $54,31 \pm 12,31$ nm e $56,03 \pm 12,52$ nm revestidas com MUA), regista-se menos aproximadamente 17% na viabilidade celular para as células incubadas com AuNPs esféricas comparativamente as AuNPs em forma de estrela na concentração 40 μ M.

É ainda possível determinar o efeito do tamanho das AuNPs na viabilidade celular das células incubadas com AuNPs esféricas revestidas com citrato e AuNPs em forma de estrela revestidas com MUA, com as primeiras a não registarem diferenças significativas para os três tamanhos testados. Registaram-se, no entanto, diferenças significativas para as células incubadas com AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA com decréscimos na viabilidade celular em todas as concentrações testadas, relativamente às AuNPs em forma de estrela de diâmetro menor (Figura 19B).

3.2.1.2 Ensaios de citotoxicidade em células HepaRG diferenciadas após incubação com as AuNPs

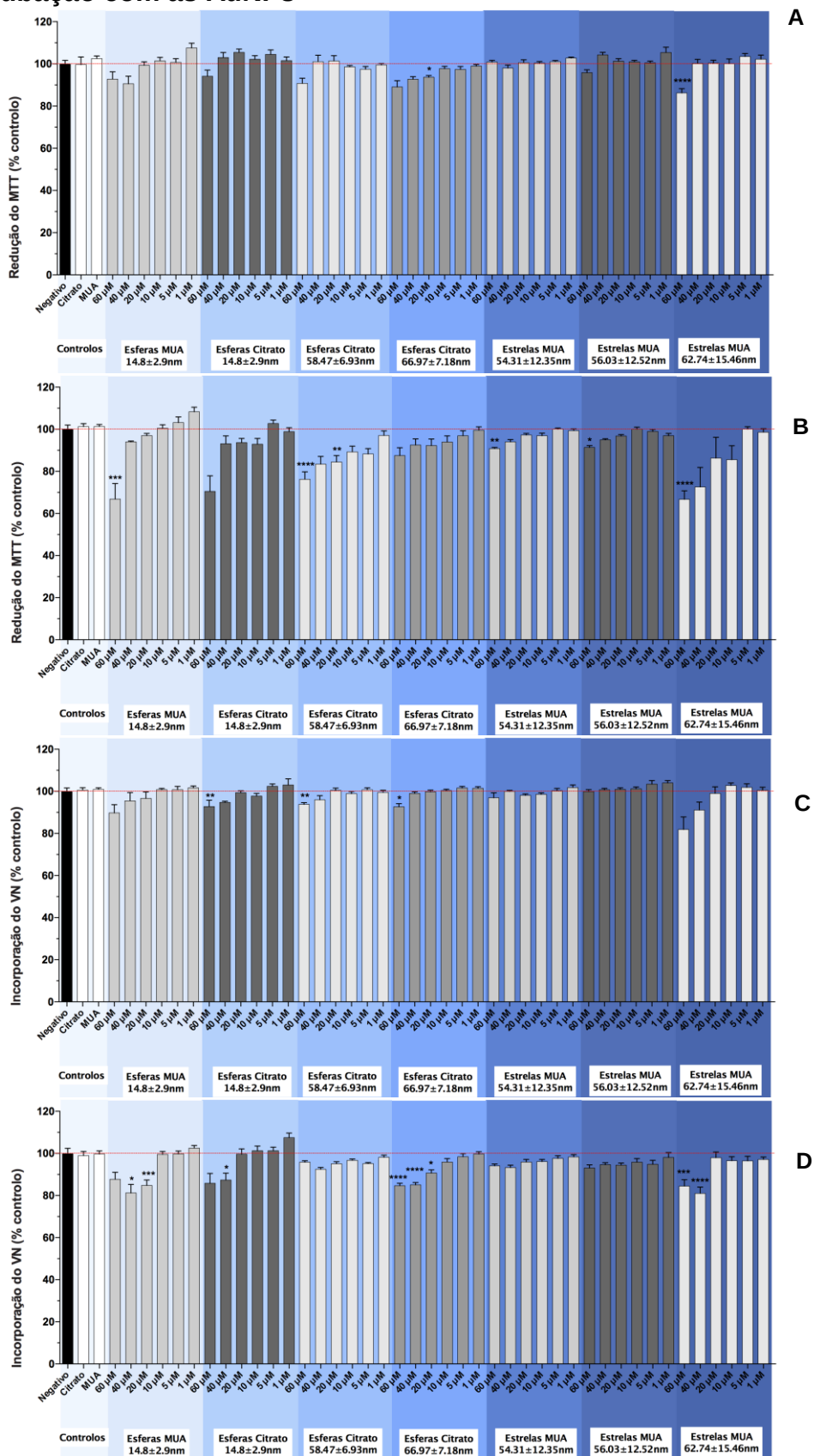


Figura 20. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nas células HepaRG diferenciadas pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D).

A citotoxicidade para a linha celular HepaRG, foi ainda avaliada após 15 dias de diferenciação destas células na presença de DMSO. Esta linha celular pode diferenciar-se em dois tipos de células, um tipo em que as células apresentam forma achatada, e outro em que se formam aglomerados de células granulares epiteliais que se assemelham a hepatócitos. A adição de 2% de DMSO e 50 μ M de hemissuccinato de hidrocortisona ao meio de cultura induz a diferenciação das células tipo-hepatócitos em mais células granulares, muito semelhantes a hepatócitos primários adultos típicos, com um ou dois núcleos, e estruturas semelhantes a canalículos biliares.

No ensaio de redução do MTT, às 24 horas de incubação (Figura 20B), registou-se uma tendência de menor viabilidade celular das células HepaRG diferenciadas quando incubadas com concentrações crescentes, tornando-se a diferença de viabilidade celular, relativamente ao controlo negativo, significativa para a concentração 60 μ M nas células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com MUA ou citrato e com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas com citrato, com diminuição de 33, 30 e 24% da viabilidade celular, respetivamente. Para as células incubadas com AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm, registaram-se diferenças na viabilidade celular para as concentrações 40 e 60 μ M, com diminuição de 27 e 33% respetivamente. O ensaio de incorporação do VN às 24 horas de incubação (Figura 20D), registou a mesma tendência observadas para o ensaio de redução do MTT.

Tal como aconteceu com as células HepaRG não diferenciadas, o efeito do revestimento, forma e tamanho das AuNPs na viabilidade celular foi avaliado. Contudo, após diferenciação, não se registaram diferenças significativas entre os resultados obtidos, para os vários parâmetros.

Em resumo, os resultados de viabilidade celular obtidos com as células HepaRG antes e após diferenciação quando incubadas com as AuNPs, diferiram ligeiramente entre si, registando-se uma tendência de maior citotoxicidade das AuNPs nas células HepaRG não diferenciadas.

3.2.1.3 Ensaios de citotoxicidade em células Caco-2 após incubação com as AuNPs

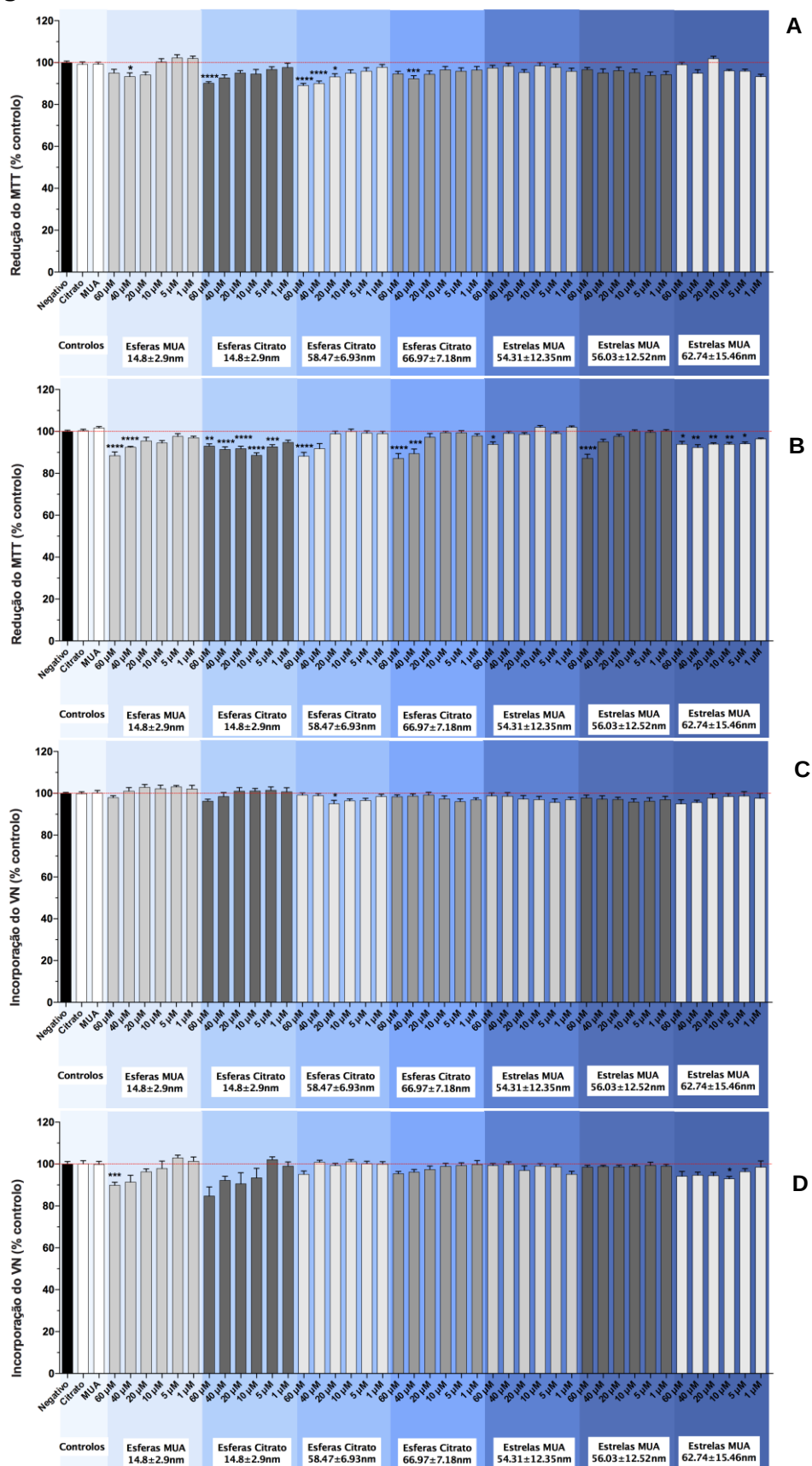


Figura 21. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nas células Caco-2 pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D).

As células Caco-2 foram incubadas com os diferentes tipos de AuNPs e sua viabilidade celular às 4 e 24 horas avaliada pelos ensaios de redução do MTT, incorporação do VN (Figura 21) e liberação de LDH (Figura 22).

Os resultados obtidos, para os ensaios de redução do MTT e incorporação do VN, mostraram uma tendência de baixa toxicidade dos diferentes tipos de AuNPs nesta linha celular, independentemente do tempo de incubação, ensaio, revestimento, forma e tamanho. Assim, além de se não registarem diferenças significativas para os efeitos de cada parâmetro avaliado, também não se registou um decréscimo da viabilidade celular com significado biológico em nenhum dos tipos de AuNPs testadas.

Além dos ensaios de redução do MTT e incorporação do VN, para esta linha celular foi ainda realizado o ensaio de liberação de LDH nos mesmos tempos de incubação, 4 e 24 horas (Figura 22).

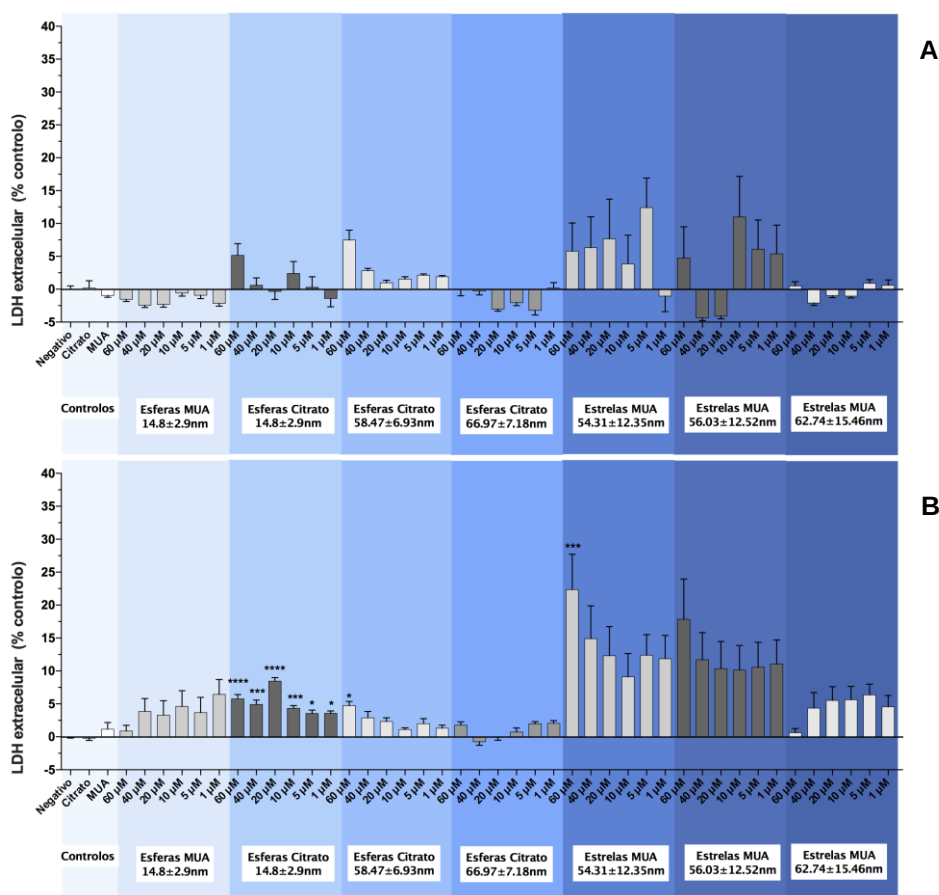


Figura 22. Avaliação da citotoxicidade nas células Caco-2, pela libertação da LDH para o espaço extracelular, das AuNPs esféricas e em forma de estrela às 4 (A) e 24 horas (B) de incubação.

Os resultados de libertação de LDH nas células Caco-2 (Figura 22), são concordantes com os resultados obtidos para esta linha celular pelos ensaios de MTT e VN (Figura 21). Nos resultados obtidos pelos ensaios de redução do MTT e incorporação do VN registaram-se pequenas diminuições da viabilidade celular, e de facto, no caso do ensaio de libertação de LDH registam-se percentagens baixas de LDH no espaço extracelular.

Para as 4 horas de incubação, não se registaram diferenças significativas entre os resultados obtidos para o controlo e os diferentes tipos de AuNPs para as diferentes concentrações. Registou-se contudo, maior percentagem de LDH no espaço extracelular para as AuNPs em forma de estrela com $54,31 \pm 12,31$ nm e $56,03 \pm 12,52$ nm revestidas com MUA mesmo que sem significado estatístico.

Às 24 horas de incubação, registou-se a mesma tendência observada para as 4 horas de incubação com maior percentagem de LDH no espaço extracelular para as AuNPs em forma de estrela, registando-se valores de LDH extracelular de aproximadamente 10 a 22% para todas as concentrações em estudo para as AuNPs em forma de estrela com $54,31 \pm 12,31$ nm e 10 a 20% para as AuNPs em forma de estrela com $56,03 \pm 12,52$ nm, ambas revestidas com MUA.

Não se registaram também diferenças estatísticas nos resultados obtidos para a libertação de LDH pelas células incubadas com os diferentes tipos de AuNPs quando avaliado o efeito do revestimento, tamanho e forma. São, contudo, exceção os resultados obtidos para as AuNPs com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com citrato, cujo aumento de LDH extracelular apresenta um valor de 8% relativamente à LDH extracelular para as células incubadas com AuNPs esféricas com $66,97 \pm 7,18$ nm revestidas com citrato, para a concentração 20 μ M (Anexo 2).

3.2.1.4 Ensaios de citotoxicidade em hepatócitos primários de rato após incubação com as AuNPs

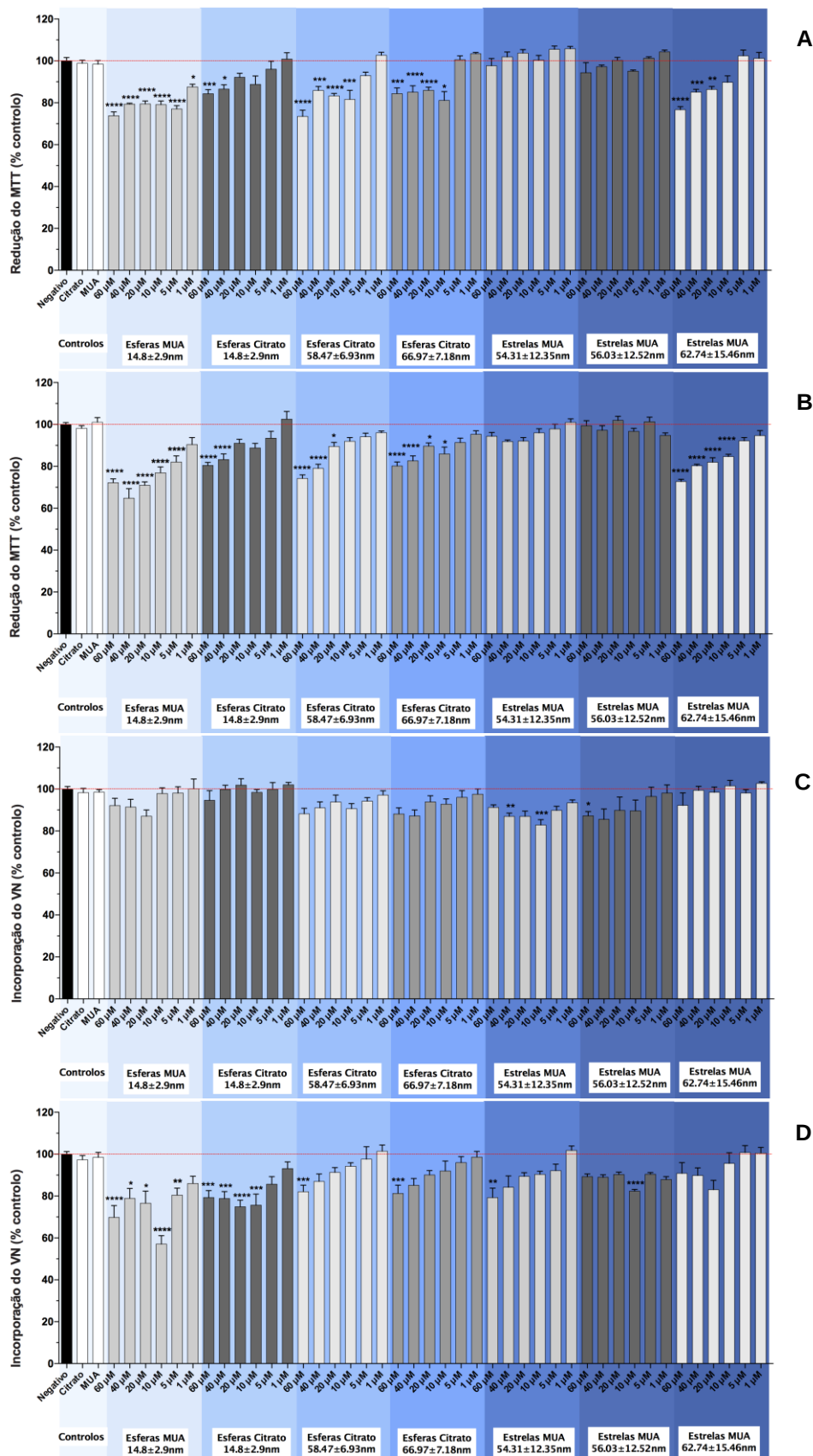


Figura 23. Avaliação da citotoxicidade das AuNPs esféricas e em forma de estrela nos hepatócitos primários de rato pelo ensaio de MTT às 4 horas (A) e às 24 horas (B) e pelo ensaio de VN às 4 horas (C) e 24 horas (D).

Além das linhas celulares imortalizadas, HepaRG e Caco-2, foram ainda realizados ensaios de viabilidade celular em hepatócitos primários de rato.

No ensaio de redução do MTT, às 4 horas de incubação, registou-se um decréscimo de viabilidade celular de aproximadamente 20-25% nas células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm revestidas com MUA, independentemente da concentração, com exceção da concentração mais baixa. Registaram-se também decréscimos de 26% e 23% para as células incubadas com AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas com citrato e AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA, respetivamente, para a concentração 60 μ M. Verificou-se também, no caso das AuNPs em forma de estrela, que os diferentes tamanhos afetaram a viabilidade celular com as AuNPs com $62,74 \pm 15,46$ nm a exercerem maior toxicidade nas células: registaram-se decréscimos de viabilidade celular de aproximadamente 20% para as concentrações mais elevadas comparativamente às AuNPs com $54,31 \pm 12,31$ nm e $56,03 \pm 12,52$ nm. Por outro lado, as AuNPs esféricas exerceram mais toxicidade sobre as células comparativamente às AuNPs em forma de estrela, com decréscimos da viabilidade celular de aproximadamente 20% para as concentrações mais elevadas nas células incubadas com AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm comparativamente às incubadas com AuNPs em forma de estrela com $54,31 \pm 12,31$ nm e $56,03 \pm 12,52$ nm.

Para as 24 horas, os resultados do ensaio de redução do MTT segue a mesma tendência de toxicidade registada às 4 horas de incubação, registando-se decréscimos de viabilidade celular de 20% para as células incubadas com AuNPs esféricas com $14,8 \pm 2,9$ nm e $66,97 \pm 7,18$ nm revestidas com citrato, para a concentração 60 μ M, e de 21 e 26% para as células incubadas com AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas com citrato, nas concentrações 40 e 60 μ M, respetivamente. Registaram-se também decréscimos da viabilidade celular entre 23-35% e entre 27-19% para as células incubadas com as AuNPs esféricas revestidas com MUA com $14,8 \pm 2,9$ nm e com as AuNPs em forma de estrela revestidas com MUA com $62,74 \pm 15,46$ nm, respetivamente, para as concentrações mais elevadas.

Os resultados obtidos para o ensaio de incorporação do VN às 24 horas de incubação, seguem a tendência registada com o ensaio de redução do MTT no mesmo tempo de incubação com exceção dos resultados obtidos para as AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA, para os quais não se registam decréscimos de viabilidade com significado biológico. Nas células incubadas com AuNPs esféricas revestidas com MUA com $14,8 \pm 2,9$ nm na concentração de 10 μ M, registou-se

uma diminuição de 43% da viabilidade registrando-se menor toxicidade destas AuNPs em concentrações mais elevadas.

Foram ainda avaliados os possíveis efeitos do revestimento, tamanho e forma na viabilidade celular dos hepatócitos primários de rato quando incubados com os diferentes tipos de AuNPs. Registaram-se apenas efeitos significativos para o tamanho e forma das AuNPs às 24 horas de incubação quando avaliada a viabilidade celular por redução do MTT. Em relação ao efeito do tamanho na viabilidade celular, registou-se que as AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA, apresentaram maior toxicidade para as células relativamente às AuNPs em forma de estrela com $54,31 \pm 12,31$ nm e $56,03 \pm 12,52$ nm revestidas com MUA, para as concentrações mais elevadas. Por sua vez, quando levada em conta a forma das AuNPs na viabilidade celular, registou-se que as AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas com MUA foram mais citotóxicas que as AuNPs em forma de estrela, registando-se para as células incubadas com as AuNPs esféricas com $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas com MUA, um decréscimo de 20% comparativamente às AuNPs em forma de estrela revestidas com MUA com $54,31 \pm 12,31$ nm e 25% comparativamente às AuNPs em forma de estrela revestidas com MUA com $56,03 \pm 12,52$ nm, para a concentração de $60 \mu\text{M}$

Para analisar os resultados obtidos, é preciso levar em consideração o contexto das condições experimentais levadas a cabo no decorrer deste trabalho. Até à data existe uma falta de consenso na literatura sobre toxicidade de nanopartículas devido aos vários métodos usados, materiais e linhas celulares. A padronização dos desenhos experimentais como a escolha do modelo e condições de exposição é necessária para possibilitar a análise comparativa dos resultados obtidos pelos diferentes grupos de investigação (16,129).

Outro fator que torna ainda mais complicada a comparação entre estudos é a falta de consenso sobre o que deve ser considerado ou não baixa toxicidade, devido à falta de um material de referência para comparação de resultados (129).

Assim, com base na literatura, verifica-se que nos estudos de citotoxicidade *in vitro* utilizando AuNPs, são utilizadas diferentes linhas celulares (humanas ou de modelos animais), diferentes tempos de incubação das células, concentrações e tipos de

nanopartículas diversificadas e métodos de avaliação diferentes. Esta diversidade de condições experimentais torna muito difícil a análise comparativa dos resultados dos diferentes estudos já realizados e, ao mesmo tempo, torna difícil a sua utilização como pontos de referência para estudos posteriores. Todas estas questões afetam a avaliação da citotoxicidade de nanopartículas afetando a relevância das conclusões obtidas. Contudo, apesar de tudo isto, podem ser retiradas algumas conclusões gerais a partir de toda a informação disponível até ao momento (122).

A biocompatibilidade das AuNPs, com diferentes tamanhos, diferentes revestimentos, diferentes cargas superficiais e em várias concentrações, tem sido demonstrada para diferentes linhas celulares (64–66,128). Contudo, outros trabalhos relatam citotoxicidade de AuNPs (54,68–70). No trabalho realizado por Vijayakumar & Ganesan (130), foram realizados precisamente os mesmos ensaios (MTT, VN e LDH) utilizados no decorrer deste trabalho. A utilização de mais do que um ensaio de viabilidade celular é uma das formas de tentar contornar alguns dos fatores que podem afetar os resultados, quer pela sua sobre- ou subvalorização. Os resultados de citotoxicidade obtidos pelos diferentes ensaios de viabilidade celular no trabalho desenvolvido por Vijayakumar & Ganesan (130) mostram algumas diferenças entre si. Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes revestimentos das AuNPs e de diferentes tempos de exposição nas linhas celulares PC-3 (células humanas de carcinoma de próstata) e MCF-7 (células humanas de carcinoma de mama). Estas linhas foram incubadas com AuNPs de cerca de 20 nm revestidas com citrato, amido ou goma-arábica. Foram ainda utilizadas células da linha celular CHO22 (células de ovário de hamster chinês), cuja viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de incorporação do VN. O efeito do revestimento na viabilidade celular foi determinado utilizando uma gama de concentrações (20, 50, 80, 110 e 140 µg/mL de AuNPs) 24 horas após exposição, não se registando diferenças significativas entre os diferentes revestimentos com a goma-arábica a mostrar tendência para menor toxicidade. Foi ainda avaliado o efeito do tempo de exposição (24, 36, 48, 60 e 72 horas) na viabilidade celular, utilizando os diferentes tipos de AuNPs e ensaios de viabilidade celular para uma concentração de 110 µg/mL de AuNPs. As células incubadas com AuNPs revestidas com goma-arábica, foram aquelas que apresentaram maiores taxas de viabilidade celular em todos os tempos avaliados, enquanto as células incubadas com AuNPs revestidas com citrato apresentaram menor viabilidade celular em todos os tempos avaliados. Os resultados obtidos no decorrer do presente trabalho vão de encontro aos resultados obtidos no trabalho realizado por Vijayakumar & Ganesan (130) relativamente ao efeito do tempo de incubação na viabilidade celular. No presente trabalho, para a linha celular HepaRG (antes e após

diferenciação) e para os hepatócitos primários de rato, registou-se um perfil de toxicidade diferente para os dois tempos de incubação, com maiores percentagens de viabilidade celular detetadas para as 4 horas de incubação em praticamente todos os tipos de AuNPs independentemente do ensaio. No caso da linha celular Caco-2 essas diferenças não são tão notórias.

Independentemente do tempo de incubação e ensaio utilizado, por comparação dos dados obtidos para os diferentes modelos celulares, parece que o mesmo tipo de AuNPs não afeta modelos celulares diferentes da mesma forma. Neste caso, para a linha celular Caco-2 o efeito das AuNPs na viabilidade celular parece ser menor comparativamente com a linha celular HepaRG e com os hepatócitos primários. Por exemplo, às 24 horas de incubação registam-se decréscimos de viabilidade celular para as células incubadas com AuNPs em forma de estrela com $62,74 \pm 15,46$ nm revestidas com MUA em todos os modelos celulares exceto nas células Caco-2. No caso dos hepatócitos primários de rato, o facto de se tratar de uma linha celular primária, pode influenciar os resultados de citotoxicidade obtidos uma vez que estas células sofreram *stress* com o seu isolamento o que pode afetar a viabilidade celular e desta forma sobrevalorizar os resultados de citotoxicidade obtidos (16). De facto, na literatura são alguns os estudos que compararam a citotoxicidade de AuNPs em diferentes linhas celulares, demonstrando que o mesmo tipo de AuNPs, com as mesmas características, nomeadamente tamanho, forma e revestimento, apresentam perfis de citotoxicidade diferentes para linhas celulares diferentes (69,131,132).

Um estudo (132) avaliou a citotoxicidade de AuNPs de 1,9 nm nas linhas celulares DU145 (células humanas cancerígenas de próstata), MDA-MB-231 (células cancerígenas humanas de mama) e L132 (células epiteliais pulmonares). As células foram incubadas com AuNPs numa gama de concentrações de 10 µg/mL até 2 mg/mL e a viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT 24 horas após incubação. Os resultados mostraram uma redução da viabilidade celular dependente da concentração nas linhas celulares DU145 e MDA-MB-231, sendo os valores de IC_{50} das AuNPs nestas linhas 16 e 12 vezes inferiores ao valor de IC_{50} das AuNPs na linha celular L132. Noutro estudo (131), células das linhas celulares A549 (células humanas de carcinoma de pulmão), NCI-H1975 (células provenientes de adenocarcinoma de pulmão humano) e A431 (células humanas de carcinoma epidermoide) foram expostas a AuNPs esféricas revestidas com citrato de $17,0 \pm 1,7$ nm nas concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml e a viabilidade celular avaliada por MTT e libertação de LDH 24 horas após exposição. Neste caso, não se

registaram diferenças de viabilidade celular para as diferentes linhas celulares, com os resultados a registarem valores de IC₅₀ de 48,9, 52,3 e 65,2 µg/mL nas linhas A549, NCI-H1975 e A431, respetivamente. Também os resultados de libertação de LDH foram semelhantes para as três linhas em estudo.

O revestimento das AuNPs é um dos parâmetros que tem merecido muita atenção por parte da comunidade científica. Apesar da natureza quimicamente inerte do ouro, o seu revestimento vai influenciar a forma como as células reconhecem as nanopartículas e consequentemente interferir no efeito toxicológico que as AuNPs poderão apresentar. Uma vez que a manipulação da superfície química das AuNPs é relativamente fácil, o que as torna passíveis de utilização em muitas áreas, são vários os trabalhos para determinar a citotoxicidade destas nanopartículas com diferentes revestimentos (72,130,133,134).

No decorrer deste trabalho foi avaliado o efeito do revestimento das AuNPs esféricas com 14,8 ± 2,9 nm na viabilidade celular. Para isso, estas AuNPs foram revestidas com citrato ou MUA. Com exceção da linha celular HepaRG sem diferenciação celular, em nenhuma outra linha celular se registaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular quando comparados os resultados obtidos pelos dois tipos de AuNPs, independentemente do tempo de incubação e do ensaio. Na linha celular HepaRG sem diferenciação celular, as AuNPs esféricas revestidas com MUA provocaram um decréscimo da viabilidade celular de 1,8 vezes comparativamente às AuNPs esféricas revestidas com citrato para as 24 horas de incubação (e apenas no ensaio de redução do MTT). Contudo, no estudo já referido por Vijayakumar & Ganesan (130), com AuNPs de cerca de 20 nm revestidas com citrato, amido ou goma-arábica a viabilidade celular, determinada por MTT, VN e libertação de LDH, foi menor para as AuNPs revestidas com citrato, comparativamente aos outros revestimentos, o que pode ser explicado pela natureza acídica do citrato em relação ao amido e à goma-arábica, em todas as linhas celulares testadas. Noutro estudo (135), células HepG2 (células de hepatoma humano) foram incubadas com AuNPs esféricas com aproximadamente 20 nm de diâmetro revestidas com citrato ou MUA, numa gama de concentrações em ouro de 0-200 µM. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT e libertação de LDH, 24 e 72 horas após incubação. Os resultados indicaram que, independentemente do revestimento, estas partículas não exerceram efeito toxico nas células HepG2.

O tamanho, a par do revestimento, é outro parâmetro importante para o efeito das nanopartículas na viabilidade celular nas diferentes linhas celulares (54,66,134,136). No decorrer deste trabalho, não se registaram diferenças significativas entre os resultados

obtidos para as AuNPs esféricas dos diferentes tamanhos analisados. No entanto, registou-se maior tendência para as AuNPs em forma de estrela de maior tamanho provocarem toxicidade como aconteceu com as células das linhas celulares HepaRG não diferenciadas e hepatócitos primários de rato, para as concentrações mais elevadas (40 e 60 μM). Estes dados, estão em desacordo com os resultados obtidos por outros autores (54), onde as AuNPs de menor tamanho foram aquelas que afetaram mais a viabilidade celular das células em estudo.

Coradeghini et al., (66) avaliaram a citotoxicidade de AuNPs de 5 e 15 nm foi utilizando o ensaio de azul tripano e a eficiência de formação de colónias (ensaio considerado promissor para a determinação de citotoxicidade por parte de nanopartículas por apresentar elevada sensibilidade comparativamente a outros ensaios). A linha celular Balb/3T3 (células de fibroblasto de rato) foi incubada com 10, 50, 100, 200 e 300 μM de AuNPs e os ensaios realizados 2, 24 e 72 horas após exposição. Os resultados obtidos pelos dois ensaios são contraditórios: para o ensaio de eficiência de formação de colónias registaram-se diferenças estatísticas entre os resultados de viabilidade obtidos para os dois tamanhos de AuNPs, com as menores a apresentarem toxicidade para concentrações superiores a 50 μM às 72 horas de incubação enquanto, para o ensaio do azul tripano não se registaram diferenças significativas entre os dois tamanhos. Os autores explicam estes resultados pelo possível efeito tóxico provocado nas células pelas AuNPs sem que haja comprometimento da integridade da membrana celular (avaliada pelo azul tripano). Outro trabalho desenvolvido por Freese et al., (134) com a linha humana HDMEC (células endoteliais microvasculares da derme) avaliou o efeito de AuNPs de 18, 35 e 65 nm na viabilidade celular, usando o ensaio de MTS, 24 e 48 h após exposição de diferentes concentrações de AuNPs, com os resultados a mostrarem também que as AuNPs, independentemente do tamanho e do tempo de incubação, não induziam toxicidade para as células.

No decorrer deste trabalho, não se registaram diferenças significativas entre os resultados obtidos para as AuNPs esféricas e em forma de estrela na linha celular HepaRG sem diferenciação independentemente do tempo de incubação e ensaio usado. No caso dos outros modelos celulares, para o ensaio de MTT, as AuNPs esféricas foram aquelas que afetaram mais a viabilidade celular nos dois tempos de incubação para os hepatócitos primários de rato, para as 4 horas de incubação para as células Caco-2 e 24 horas para as células HepaRG não diferenciadas, para as concentrações mais elevadas. Contudo, para se poder neste caso, e em outros casos presentes na literatura, atribuir à

forma o efeito sobre a viabilidade celular é da maior importância avaliar o efeito do revestimento (137), uma vez que as duas formas apresentam diferentes revestimentos. No decorrer deste trabalho foi então avaliado o efeito do revestimento (MUA ou citrato de sódio) sem AuNPs, não se registrando diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular em relação ao controle negativo.

Uma das formas de AuNPs que tem suscitado interesse são os bastonetes (128,137). Estudos de viabilidade celular comparando a citotoxicidade de AuNPs esféricas e em forma de bastonete têm apresentado resultados contraditórios. Por um lado, um estudo conduzido por Arnida et al., (128) demonstrou, utilizando o ensaio de MTT, resultados semelhantes entre as duas formas de AuNPs para a linha celular PC-3 88 horas após exposição às AuNPs na concentração de 1,5 nM, com as duas formas a não provocarem efeito na viabilidade celular. Contudo, num outro estudo conduzido por Zhang et al., (137), os resultados foram estatisticamente diferentes para as duas formas. Aqui, células da linha celular HEP-2 foram incubadas com AuNPs esféricas (revestidas com citrato) e AuNPs em forma de bastonete revestidas com CTAB, PAH ou PSS numa gama de concentrações de 1 a 10% (com 1% a corresponder a 10^{-12} M) e a viabilidade celular determinada pelo ensaio de redução do MTT, 1 hora após exposição. Os resultados mostraram maior toxicidade para as AuNPs em forma de bastonete, independentemente do revestimento, e para as concentrações mais altas, mas com maior incidência no caso das AuNPs revestidas com CTAB (revestimento já associado a diminuição da viabilidade celular). Mais recentemente, foi comparada a citotoxicidade de AuNPs esféricas com AuNPs em forma de estrela (138,139), forma também avaliada no decorrer deste trabalho. Num desses estudos (138), AuNPs esféricas ou em forma de estrela (revestidas com ascorbato ou PEG) com cerca de 50 nm foram incubadas com células da linha celular HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana) numa gama de concentrações de AuNPs de 0,001 a 100 pM e a viabilidade celular determinada pelo ensaio de redução do MTT, 24 horas após exposição. Foram também utilizadas AuNPs esféricas com os mesmos revestimentos mas de menor tamanho (15 nm). Os resultados indicaram que as AuNPs em forma de estrela, independentemente do revestimento, provocavam um decréscimo da viabilidade celular de cerca de 50% para a concentração de 1 pM, enquanto para a mesma concentração, as AuNPs esféricas, independentemente do tamanho, não alteraram a viabilidade celular. De salientar ainda que é preciso uma concentração 100 vezes superior, ou seja de 100 pM, para as AuNPs esféricas afetarem a viabilidade celular com valores equiparáveis aos das AuNPs em forma de estrela para a concentração de 1 pM. Num outro estudo (139), células de fibroblasto de pele humana (CCL-110) e células endoteliais de gordura de rato foram

expostas a AuNPs esféricas (revestidas com citrato) e em forma de estrela com cerca de 60 e 34 nm, respetivamente, numa gama de concentrações de 0,2 a 400 µg/mL de AuNPs e a viabilidade celular avaliada pelo ensaio de redução do MTS, 1 e 4 dias após exposição. Neste caso, os resultados obtidos indicam menor toxicidade por parte das AuNPs em forma de estrela independentemente da linha celular e tempos de incubação. As AuNPs esféricas mostraram-se letais para as células para a concentração de 40 µg/mL de AuNPs, enquanto as AuNPs em forma de estrela provocaram 20-40% de perda de viabilidade celular para uma concentração 10 vezes maior, independentemente da linha celular.

3.3 Perfil de biodistribuição das AuNPs *in vivo* após administração oral

Foi realizado um estudo preliminar *in vivo* para avaliação da distribuição de AuNPs esféricas ou em forma de estrela após administração oral. Foram administradas a ratos Wistar machos AuNPs esféricas de $58,47 \pm 6,93$ nm (2 animais) e AuNPs em forma de estrela de $54,31 \pm 12,31$ nm (2 animais) numa dose equivalente a 0.6 mg/kg de ouro (dose única). Após 24 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano, e sacrificados por exsanguinação, com colheita de sangue para tubos heparanizados a partir da porção abdominal da veia cava descendente. Recolheram-se depois os órgãos/tecidos, nomeadamente o fígado, o coração, os pulmões, o baço, os rins, o esófago, o estômago (bem como o conteúdo estomacal), o intestino delgado, o intestino grosso, os testículos, uma amostra de músculo, o cérebro, uma amostra de osso (fémur), o timo e a traqueia.

O perfil de distribuição das AuNPs foi determinado com base no conteúdo em ouro dos diferentes órgãos e tecidos recolhidos e analisados por EAA-AE. A Tabela 4 ilustra o perfil de distribuição das AuNPs de forma esférica de $58,47 \pm 6,93$ nm revestidas a citrato e das AuNPs em forma de estrela de $54,31 \pm 12,31$ nm, nos diferentes órgãos e tecidos de rato analisados, com os resultados expressos em µg/L para sangue e urina, µg/kg para os tecidos e % da dose de ouro administrada.

Tabela 4. Distribuição de ouro pelos diferentes órgãos e tecidos de rato, 24 h após a administração oral de AuNPs esféricas revestidas com citrato e em forma de estrela revestidas com MUA.

Órgão/tecido	Concentração em ouro (µg/kg)		% Dose administrada	
	AuNPs esféricas (58,47 ± 6,93 nm)	AuNPs estrela (54,31± 12,31 nm)	AuNPs esféricas (58,47 ± 6,93 nm)	AuNPs estrela (54,31± 12,31 nm)
Baço	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Conteúdo estomacal	147 ± 0,00	21,9 ± 0,00	0,018 ± 0,00	0,006 ± 0,00
Coração	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Esôfago	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Estômago	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Fígado	6,64 ± 1,30	9,04 ± 0,27	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,002
Intestino delgado	8,37 ± 2,14	27,15 ± 0,15	0,02 ± 0,006	0,06 ± 0,0005
Intestino grosso	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Músculo	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Osso	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Rins	48,10 ± 7,80	43,15 ± 13,95	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Testículos	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Sangue	13,09 ± 6,22*	8,93 ± 0,13*	0,00003 ± 0,000005	0,00002 ± 0,00
Urina	14,95 ± 0,95*	10,85 ± 7,85*	0,00008 ± 0,0000005	0,00006 ± 0,00003
Fezes	15900 ± 600	12000 ± 1400	41,65 ± 2,65	27,95 ± 4,75

* Valores em µg/L.

Os resultados encontram-se expressos como média ± erro padrão da média.

LQ - Limite de quantificação (2,46 µg/ml).

Comparando os resultados obtidos para as duas formas de AuNPs, descritos na Tabela 4, constata-se que o perfil de distribuição obtido para os dois tipos de AuNPs é bastante semelhante. Ao final de 24 horas, para ambas as formas de AuNPs foi detetado ouro, ainda que em concentrações muito baixas, no fígado, intestino delgado e rins. Foi ainda detetado ouro no conteúdo retirado do estômago, sangue, urina e fezes. No caso das fezes, a concentração em ouro detetada corresponde a aproximadamente 42% e 28% da dose administrada de AuNPs esféricas e em forma de estrela, respetivamente.

Apesar de até ao momento não existirem na literatura estudos *in vivo* de biocinética, que comparem o perfil cinético de AuNPs de diferentes formas, independentemente da via de administração, percebe-se que, para a via de administração oral, o perfil determinado neste trabalho vai de encontro com os resultados obtidos em outros estudos (82,89). Quando administradas por via oral, a maior parte das AuNPs acaba por não ser absorvida. Contudo, as concentrações em ouro detetadas nos diferentes órgãos

(geralmente órgãos do trato gastrointestinal, fígado e rins) correspondem a uma percentagem muito reduzida em relação à totalidade de AuNPs administradas (82,89). Hillyer & Albrecht, em 2001 (82), administraram AuNPs revestidas com citrato (4, 10, 28 e 58 nm) *ad libitum* pela água a ratinhos, com uma concentração de 2×10^5 partes por bilhão durante 7 dias. Os animais foram sacrificados 12 horas após a substituição da água suplementada com AuNPs por água corrente. Neste estudo, as AuNPs com tamanho semelhante ao utilizado no presente trabalho, são aquelas que apresentam menor distribuição sendo detetadas em menos órgãos e em menores concentrações. Neste estudo de Hillyer & Albrecht, não foi, contudo, avaliada a concentração em ouro nas fezes.

A maioria dos estudos *in vivo*, de avaliação da biocinética de AuNPs, referem-se no entanto, à via de administração intravenosa (98–102). Para estes casos, são geralmente detetadas maiores percentagens de ouro nos órgãos e tecidos avaliados em relação às determinadas por ensaios *in vivo* após administração oral de AuNPs, com estas últimas a terem que enfrentar, antes de chegar à corrente sanguínea e consequentemente serem distribuídas pelo organismo, barreiras fisiológicas no trato gastrointestinal que condicionam a sua absorção e transporte para a corrente sanguínea.

4. CONCLUSÕES

As conclusões retiradas dos resultados obtidos no âmbito deste estudo e que são apresentados na presente dissertação, tentam responder aos objetivos inicialmente propostos.

Assim, verificou-se que a síntese de AuNPs é um processo moroso que necessita de um grande rigor e controlo de todas as condições experimentais, nomeadamente, a temperatura, tempos de reação, quantidade de reagentes e adição destes de forma rigorosa e calculada. Com especial incidência para as AuNPs em forma de estrela, o descuido nestes parâmetros levam a sínteses ineficientes, muitas vezes com a formação de nanopartículas sem as características pretendidas ou com uma elevada polidispersão de tamanhos.

Depois de sintetizadas e funcionalizadas as AuNPs esféricas e em forma de estrela com as características desejadas, procedeu-se à avaliação da sua citotoxicidade nos modelos celulares HepaRG, antes e após diferenciação, Caco-2 e hepatócitos primários de rato, recorrendo-se a vários ensaios descritos na literatura como sendo apropriados para a avaliação da citotoxicidade de nanopartículas. As linhas celulares utilizadas são consideradas representativas da citotoxicidade hepática, para o caso das células HepaRG e dos hepatócitos isolados de rato, e da citotoxicidade intestinal no caso das células Caco-2.

Assim, as AuNPs esféricas avaliadas apresentaram diâmetros de $14,8 \pm 2,9$ nm (revestidas com citrato ou MUA), $58,47 \pm 6,93$ nm e $66,97 \pm 7,18$ nm (revestidas com citrato), enquanto as AuNPs em forma de estrela apresentavam diâmetros de $54,31 \pm 12,31$ nm, $56,03 \pm 12,52$ nm e $62,74 \pm 15,46$ nm (revestidas com MUA). A sua citotoxicidade nos modelos celulares mencionados acima, foi avaliada 4 e 24 horas após incubação, numa gama de concentrações de 1 a 60 μ M. A citotoxicidade, por via da determinação da viabilidade celular, foi avaliada pelos ensaios de redução do MTT, incorporação do VN e libertação de LDH.

Para verificar se os revestimentos das AuNPs são tóxicos para as células, foram realizados os mesmos ensaios, expondo as células aos revestimentos das AuNPs. Os resultados obtidos permitem concluir que os revestimentos das AuNPs utilizados ao longo deste trabalho, nas concentrações testadas, e para os mesmos tempos de incubação, não evidenciaram sinais de citotoxicidade. É de máxima importância realizar ensaios experimentais nas mesmas condições para as AuNPs e simultaneamente para os seus agentes de revestimento na ausência de AuNPs, de forma a descartar por completo a hipótese da citotoxicidade apresentada ser relativa ao agente de revestimento e não às

AuNPs. Assim, tendo em conta os resultados obtidos para as situações experimentais descritas, pode concluir-se que os agentes de revestimento não apresentam toxicidade para as células HepaRG, Caco-2 e hepatócitos primários de rato.

Os resultados obtidos mostram que as AuNPs apresentaram maior citotoxicidade após 24 horas de incubação comparativamente às 4 horas de incubação, para a linha celular HepaRG, antes e após diferenciação, nas condições experimentais descritas neste trabalho. Para os outros modelos celulares, Caco-2 e hepatócitos primários de rato, essa tendência não é tão evidente.

Nas condições experimentais descritas neste trabalho regista-se ainda a tendência da viabilidade celular ser mais afetada para as concentrações mais elevadas utilizadas neste trabalho (60, 40 e 20 μ M), denotando-se um efeito citotóxico dependente da concentração testada.

No caso das células HepaRG, parece que nas condições experimentais descritas neste trabalho, a sua diferenciação não influenciou significativamente os resultados de citotoxicidade dos diferentes tipos de AuNPs. As células Caco-2 parecem ser aquelas para as quais as AuNPs, exercem menos toxicidade com a diminuição da viabilidade celular na ordem dos 10%, mesmo para as concentrações mais elevadas,. Para esta linha celular, foi ainda avaliada a libertação de LDH para o espaço extracelular concluindo-se que os resultados obtidos para este ensaio vão de encontro aos resultados nos ensaios de redução do MTT e incorporação do VN, confirmando a baixa toxicidade das AuNPs para esta linha celular.

Além das linhas imortalizadas, foi ainda avaliado o efeito das AuNPs na viabilidade celular de hepatócitos primários de rato. Os resultados para este modelo celular, são aqueles que apresentam maior citotoxicidade das AuNPs em estudo. Contudo, tratando-se de uma linha primária não se pode excluir o *stress* a que estas células estão sujeitas quando isoladas, o que pode influenciar os valores de toxicidade obtidos.

Mas o principal objetivo deste trabalho, era avaliar o efeito de várias características das AuNPs na sua toxicidade, nomeadamente o efeito do revestimento, tamanho e forma na citotoxicidade nos modelos celulares já mencionados, bem como o efeito da forma das AuNPs no perfil de distribuição destas nanopartículas após administração oral a ratos.

Quando avaliado o efeito do revestimento, só se registam diferenças para a linha celular HepaRG antes da diferenciação e nas concentrações mais elevadas. Para as

AuNPs esféricas revestidas com MUA registam-se descidas da viabilidade celular de aproximadamente 50% contra os 10% registados para as AuNPs esféricas, com o mesmo tamanho, revestidas a citrato. Para todos os outros modelos celulares não se registam diferenças de toxicidade nas AuNPs esféricas revestidas com os diferentes revestimentos.

Relativamente ao tamanho, contrariamente ao que seria de esperar tendo em conta a literatura existente, registou-se que entre as AuNPs em forma de estrela, as de maior tamanho registaram maior toxicidade, nas concentrações mais elevadas, nas células HepaRG (sem diferenciação) e nos hepatócitos primários de rato. No caso das AuNPs esféricas não se registaram diferenças no perfil de toxicidade dos três tamanhos avaliados nas condições experimentais utilizadas no decorrer deste trabalho.

Já a forma parece afetar o perfil de toxicidade das AuNPs testadas no decorrer deste trabalho. Em todas os modelos celulares, com exceção das células HepaRG diferenciadas, registam-se diferenças na viabilidade celular entre AuNPs esféricas e em forma de estrela, para as concentrações mais elevadas, com as primeiras a mostrarem-se mais tóxicas para as células, nestas condições experimentais.

Assim, conclui-se que a forma apresentada pelas AuNPs influencia a sua toxicidade celular, nas condições experimentais descritas no decorrer deste trabalho, com especial incidência para as concentrações mais elevadas, com as AuNPs em forma de estrela a mostrarem-se menos tóxicas do que as AuNPs esféricas. De salientar ainda que, apesar das duas formas de AuNPs apresentarem revestimentos diferentes, pelos resultados obtidos para os controlos de veículo, pode concluir-se que a toxicidade obtida se refere efetivamente às AuNPs.

Como referido, foi ainda realizado um ensaio *in vivo*, para a avaliação da distribuição de AuNPs das duas formas utilizadas no decorrer deste trabalho (esférica e estrela), 24 horas após administração oral das AuNPs a ratos Wistar. A partir dos resultados obtidos pode concluir-se que a biodistribuição das AuNPs após administração oral é muito reduzida, o que vai de encontro com os resultados descritos na literatura, e que a forma, tendo em conta os procedimentos experimentais utilizados, não influencia o seu perfil de distribuição.

Apesar dos resultados obtidos, quer para a avaliação da toxicidade *in vitro* quer para a avaliação da biodistribuição *in vivo*, tendo em conta a diversidade de protocolos existentes, é muito difícil chegar a uma conclusão sobre os efeitos das diferentes características das AuNPs que se possa extrapolar para todos os tipos de AuNPs. São

então necessários mais ensaios, bem como a uniformização dos protocolos, de forma a avaliar a toxicidade e perfil de ADME dos diferentes tipos de AuNPs. Contudo, pode prever-se, tendo em conta todos os ensaios já realizados, que as diferentes características intrínsecas de cada tipo de AuNPs, contribuam para os efeitos toxicológicos e perfil de ADME destes materiais.

5.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Bhushan B. Introduction to Nanotechnology. Springer Handbook of Nanotechnology. 2010; 1–15.
2. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Particle and fibre toxicology. 2006; 3:11
3. Calzolari L, Gilliland D, Rossi F. Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review. Food Additives & Contaminants: Part A. 2012; 29:8, 1183–93.
4. Corbett J, McKeown PA, Peggs GN, Whatmore R. Nanotechnology: International Developments and Emerging Products. CIRP Ann - Manuf Technol. 2000; 49:523–45.
5. Fierascu RC, Ion RM, Dumitriu I. Plasmonic Materials For Biomedical Applications. In: 6th Workshop on European Scientific and Industrial Collaboration on promoting Advanced Technologies in Manufacturing. WESIC'08; 2008 September 25-26; Bucharest, Romania.
6. The Royal Society Policy Document. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. 2004
7. Card JW, Jonaitis TS, Tafazoli S, Magnuson B. An appraisal of the published literature on the safety and toxicity of food-related nanomaterials. Crit Rev Toxicol. 2011; 41:22–49.
8. Tuinier R, de Kruif CG. Stability of casein micelles in milk. J Chem Phys. 2002; 117:1290.
9. Food Safety Authority of Ireland. The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries. 2008.
10. Logothetidis S. Nanotechnology in medicine: The medicine of tomorrow and nanomedicine. Hippokratia. 2006; 10:7–21.

11. Morganti P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2010; 3:5–13.
12. Wong YWH, Yuen CWM, Leung MYS, Ku SKA, Lam HLI. Selected applications of nanotechnology in textiles. *Autex Res J*. 2006; 6:1–8.
13. Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdörster G. Safe handling of nanotechnology. *Nature*. 2006; 444:267–9.
14. Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med*. 2010; 267:89–105.
15. Krug HF, Wick P. Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011; 50:1260–78.
16. Stone V, Johnston H, Schins RPF. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol*. 2009; 39:613–26.
17. Maurer-Jones MA, Haynes CL. Toward Correlation in In Vivo and In Vitro Nanotoxicology Studies. *J Law, Med Ethics*. 2012; 40:795–801.
18. Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. 2007; 270–7.
19. Valcárcel M, López-Lorente ÁI. *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*. 1st ed. Elsevier B.V.; 2014.
20. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*. 2005; 307:538–44.
21. Kuan C-Y, Yee-Fung W, Yuen K-H, Liong M-T. Nanotech: propensity in foods and bioactives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012; 52:55–71.
22. Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew Chemie - Int Ed*. 2004; 43:6042–108.

23. Kango S, Kalia S, Celli A, Njuguna J, Habibi Y, Kumar R. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites - A review. *Prog Polym Sci.* 2013; 38:1232–61.
24. Sanchez C, Belleville P, Popall M, Nicole L. Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chem Soc Rev.* 2011; 40:696–753.
25. Cockburn A, Bradford R, Buck N, Constable A, Edwards G, Haber B, Hepburn P, Howlett J, Kampers F, Klein, C, Radomski M, Stamm H, Wijnhoven S, Wildemann T. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50:2224–42.
26. Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17:547–56.
27. Eustis S, el-Sayed M A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev.* 2006; 35:209–17.
28. Ladj R, Bitar a, Eissa M, Mugnier Y, Le Dantec R, Fessi H, Elaissari A. Individual inorganic nanoparticles: preparation, functionalization and *in vitro* biomedical diagnostic applications. *J Mater Chem B.* 2013; 1:1381–96.
29. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60:1307–15.
30. Eck W, Nicholson AI, Zentgraf H, Semmler W, Bartling S. Anti-CD4-targeted gold nanoparticles induce specific contrast enhancement of peripheral lymph nodes in X-ray computed tomography of live mice. *Nano Lett.* 2010; 10:2318–22.
31. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009; 38:1759–82.
32. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60:1289–306.

33. Ai K, Liu Y, Lu L. Hydrogen-Bonding Recognition-Induced Color Change of Gold Nanoparticles for Visual Detection of Melamine in Raw Milk and Infant Formula - *Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)*. 2009; 9496–7.
34. Verma MS, Rogowski JL, Jones L, Gu FX. Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles. *Biotechnol Adv.* 2015; 33:666–80.
35. Willets K a, Van Duyne RP. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu Rev Phys Chem.* 2007; 58:267–97.
36. Nehl CL, Hafner JH. Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. *J Mater Chem.* 2008; 18:2415.
37. Hao F, Nehl CL, Hafner JH, Nordlander P. Plasmon resonances of a gold nanostar. *Nano Lett.* 2007; 7:729–32.
38. Zhao P, Li N, Astruc D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coord Chem Rev.* 2013; 257:638–65.
39. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of Colloidal Gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951;11:55–75.
40. Kamat P V. Photophysical, Photochemical and photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 2002; 106:7729–44.
41. Kimling J, Maier M, Okenve V, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevitch method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B.* 2006; 110:15700–7.
42. Sivaraman SK, Kumar S, Santhanam V. Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The role of chloroauric acid. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 361:543–7.
43. Philip D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2008; 71:80–5.
44. Sperling R a, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2010; 368:1333–83.

45. Senthil Kumar P, Pastoriza-Santos I, Rodríguez-González B, Javier García de Abajo F, Liz-Marzán LM. High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology*. 2008; 19:015606.
46. Bigall NC, Härtling T, Klose M, Simon P, Eng LM, Eychmüller A. Monodisperse platinum nanospheres with adjustable diameters from 10 to 100 nm: Synthesis and distinct optical properties. *Nano Lett*. 2008; 8:4588–92.
47. Perrault SD, Chan WCW. Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *J Am Chem Soc*. 2009; 131:17042–3.
48. Bastús NG, Comenge J, Puentes V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir*. 2011; 27:11098–105.
49. Nagarajan R. Nanoparticles : Building blocks for nanotechnology. *Am Chem Soc*. 2008; 2–14.
50. Templeton AC, Wuelfing WP, Murray RW. Monolayer-protected cluster molecules. *Acc Chem Res*. 2000; 33:27–36.
51. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev*. 2005; 105:1103–69.
52. Du D, Ding J, Cai J, Zhang J, Liu L. In situ electrodeposited nanoparticles for facilitating electron transfer across self-assembled monolayers in biosensor design. *Talanta*. 2008; 74:1337–43.
53. Lévy R, Thanh NTK, Christopher Doty R, Hussain I, Nichols RJ, Schiffrin DJ, Brust M, Fernig DG. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2004; 126:10076–84.
54. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jähnen-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 2007; 3:1941–9.

55. Chithrani BD, Chan WCW. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007; 7:1542–50.
56. Mahmood M, Casciano D a., Mocan T, Iancu C, Xu Y, Mocan L, Iancu DT, Dervishi E, Li Z, Abdalmuhsen M, Biris AR, Ali N, Howard P, Biris AS. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J Appl Toxicol.* 2010; 30:74–83.
57. Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques. *Environ Sci Technol.* 2006; 40:4353–9.
58. Kettiger H, Schipanski A, Wick P, Huwyler J. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: From cell to organism. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:3255–69.
59. Rima W, Sancey L, Aloy MT, Armandy E, Alcantara GB, Epicier T, Malchère A, Joly-Pottuz L, Mowat P, Lux F, Tillement O, Burdin B, Rivoire A, Boulé C, Anselme-Bertrand I, Pourchez Jérémie, Cottier M, Roux S, Rodriguez-Lafrasse C, Perriat P. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials.* 2013; 34:181–95.
60. Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, Brandau W, Simon U, Jahnen-Dechent W. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small.* 2009; 5:2067–76.
61. Rivera Gil P, Hühn D, del Mercato LL, Sasse D, Parak WJ. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacol Res.* 2010; 62:115–25.
62. Paino IMM, Marangoni VS, de Oliveira RDC, Antunes LMG, Zucolotto V. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear human cells. *Toxicol Lett.* 2012; 119–25.
63. Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro JM, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today.* 2011; 6:446–65.

64. Villiers CL, Freitas H, Couderc R, Villiers MB, Marche PN. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J Nanoparticle Res.* 2010; 12:55–60.
65. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005; 1:325–7.
66. Coradeghini R, Gioria S, García CP, Nativo P, Franchini F, Gilliland D, Ponti J, Rossi F. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol Lett.* 2013; 217:205–16.
67. Khan JA, Pillai B, Das TK, Singh Y, Maiti S. Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *ChemBioChem.* 2007; 8:1237–40.
68. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 2004; 15:897–900.
69. Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P, Dasgupta AK. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2007; 3:111–9.
70. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir.* 2005; 21:10644–54.
71. Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain K a. Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol Ther.* 2008; 120:35–42.
72. Hauck TS, Ghazani A a., Chan WCW. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small.* 2008; 4:153–9.
73. Alkilany AM, Nagaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, Wyatt MD. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small.* 2009; 5:701–8.

74. Vetten M a, Tlotleng N, Tanner Rascher D, Skepu A, Keter FK, Boodhia K, Koekemoer L, Andraos C, Tshikhudo R, Gulumian M. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10:50.
75. Li S-D, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008; 5:496–504.
76. Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJ a M. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007; 49:217–29.
77. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:823–39.
78. Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 1992; 97:193–9.
79. Alger H, Momcilovic D, Carlander D, Duncan T V. Methods to evaluate uptake of engineered nanomaterials by the alimentary tract. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014; 13:705–29.
80. Borel T, Sabliov CM. Nanodelivery of bioactive components for food applications: types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2014; 5:197–213.
81. Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Préat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release.* 2006; 116:1–27.
82. Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2001; 90:1927–36.
83. Florence AT. Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? *Drug Discov Today Technol.* 2005; 2(1):75–81.

84. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *J Pharm Pharmacol.* 1990; 42:821–6.
85. Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticulates: Neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical Research.* 1997; 259–66.
86. Hussain N. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50:107–42.
87. Baek M, Chung H-E, Yu J, Lee J-A, Kim T-H, Oh J-M, Lee W-J, Paek S-M, Lee JK, Jeong J, Choy J-H, Choi S-J. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:3081–97.
88. Cho W-S, Kang B-C, Lee JK, Jeong J, Che J-H, Seok SH. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10:9.
89. Schleh C, Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schäffler M, Schmid G, Simon U, Kreyling W. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology.* 2012; 6:36–46.
90. Crosera M, Bovenzi M, Maina G, Adami G, Zanette C, Florio C, Larese FF. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of the literature. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009; 82:1043–55.
91. Labouta HI, Schneider M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2013; 9:39–54.
92. Baroli B. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? *J Pharm Sci.* 2010; 99:21–50.
93. Labouta HI, Liu DC, Lin LL, Butler MK, Grice JE, Raphael AP, Kraus T, El-Khordagui LK, Soyer HP, Roberts MS, Schneider M, Prow TW. Gold nanoparticle penetration and reduced metabolism in human skin by toluene. *Pharm Res.* 2011; 28:2931–44.

94. Desai P, Patlolla RR, Singh M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol Membr Biol*. 2010; 27:247–59.
95. Newman MD, Stotland M, Ellis JI. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *J Am Acad Dermatol*. 2009; 61:685–92.
96. Van Der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, Gremmer ER, Mast J, Peters RJB, Hollman PCH, Hendriksen PJM, Marvin HJP, Peijnenburg AACM, Bouwmeester H. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*. 2012; 6:7427–42.
97. Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling R a., Wenk A, Takenaka S, Schleh C, Kissel T, Parak WJ, Kreyling W. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials*. 2010; 31:6574–81.
98. Morais T, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Maia S, Gomes P, Pereira E, Fraga S, Carmo H, Bastos ML. Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012; 80:185–93.
99. Fraga S, Brandão A, Soares ME, Morais T, Duarte JA, Pereira L, Soares L, Neves C, Pereira E, Bastos ML, Carmo H. Short- and long-term distribution and toxicity of gold nanoparticles in the rat after a single-dose intravenous administration. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2014; 10:1757–66.
100. Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova L V., Khlebtsov BN, Kogan BY, Akchurin GG, Shantrocha AV, Maksimova IL, Khlebtsov NG, Tuchin VV. Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery. *J Biophotonics*. 2009; 2:292–302.
101. Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008; 66:274–80.

102. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ a M, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 2008; 29:1912–9.
103. Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka J, Schäffler M, Takenaka S, Mollher W, Schmid G, Simon U, Kreyling W. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011; 77:407–16.
104. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*. 2006; 114:165–72.
105. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofo a. M. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59:627–47.
106. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LWK, Nie S. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*. 2004; 22:969–76.
107. Ballou B, Lagerholm BC, Ernst L a, Bruchez MP, Waggoner a S. Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjug Chem*. 2004; 15:79–86.
108. Sadauskas E, Danscher G, Stoltenberg M, Vogel U, Larsen A, Wallin H. Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2009; 5:162–9.
109. Park K, Park E-J, Chun IK, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch Pharm Res*. 2011; 34:153–8.
110. Yuan H, Khoury CG, Hwang H, Wilson CM, Grant G a, Vo-Dinh T. Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology*. 2012; 23:075102.
111. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem*. 2007; 79:4215–21.

112. Brundle CR, Evans CA, Wilson S. Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films. 1992
113. Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8:381.
114. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanoparticle Res*. 2008; 10:89–96.
115. Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG Cells as an *in Vitro* Model for Human Drug Metabolism Studies. *Drug Metab Dispos*. 2008; 36:1444–52.
116. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati a., Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*. 2005; 21:1–26.
117. Shulman M, Nahmias Y. Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes. *Methods Mol Biol*. 2013; 945:109–21.
118. Dias-da-Silva D, Arbo MD, Valente MJ, Bastos ML, Carmo H. Hepatotoxicity of piperazine designer drugs: Comparison of different in vitro models. *Toxicol Vitro*. 2015; 29:987–96.
119. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 72:370–7.
120. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55–63.
121. Fotakis G, Timbrell J. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006; 160:171–7.
122. Borenfreund E, Puerner J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods*. 1985; 9:7–9.

123. Faria H. Estudo Comparativo de Citotoxicidade e Internalização de Nanopartículas de Ouro com Diferentes Revestimentos. Fac Farmácia da Univ do Porto Diss Mestr. 2010;
124. Rodríguez-Oliveros R, Sánchez-Gil J a. Gold nanostars as thermoplasmonic nanoparticles for optical heating. *Opt Express*. 2012; 20:621.
125. Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*. 2005; 21:9303–7.
126. Kaufman ED, Belyea J, Johnson MC, Nicholson ZM, Ricks JL, Shah PK, Bayless M, Pettersson T, Feldoto Z, Blomberg E, Claesson P, Franzen S. Probing protein adsorption onto mercaptoundecanoic acid stabilized gold nanoparticles and surfaces by quartz crystal microbalance and ζ -potential measurements. *Langmuir*. 2007; 23:6053–62.
127. Nath N, Chilkoti a. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc*. 2001; 123:8197–202.
128. Arnida, Malugin A, Ghandehari H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: A comparative study of rods and spheres. *J Appl Toxicol*. 2010; 30:212–7.
129. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanopartides. *Small*. 2008; 4:26–49.
130. Vijayakumar S, Ganesan S. *In vitro* cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *J Nanomater*. 2012.
131. Choi SY, Jeong S, Jang SH, Park J, Park JH, Ock KS, Lee SY, Joo SW. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol Vitro*. 2012; 26:229–37.
132. Coulter J a., Jain S, Butterworth KT, Taggart LE, Dickson GR, McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Trainor C, Hounsell AR, O'Sullivan JM, Schettino G, Currell FJ, Hirst DG, Prise KM. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:2673–85.

133. Freese C, Uboldi C, Gibson MI, Unger RE, Weksler BB, Romero I, Couraud P-O, Kirkpatrick CJ. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2012; 9:1
134. Freese C, Gibson MI, Klok HA, Unger RE, Kirkpatrick CJ. Size- and coating-dependent uptake of polymer-coated gold nanoparticles in primary human dermal microvascular endothelial cells. *Biomacromolecules.* 2012; 13:1533–43.
135. Fraga S, Faria H, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Pereira E, Costa-Pereira C, Teixeira JP, Bastos ML, Carmo H. Influence of the surface coating on the cytotoxicity, genotoxicity and uptake of gold nanoparticles in human HepG2 cells. *J Appl Toxicol.* 2013; 33:1111–9.
136. Vedantam P, Huang G, Tzeng TRJ. Size-dependent cellular toxicity and uptake of commercial colloidal gold nanoparticles in DU-145 cells. *Cancer Nanotechnol.* 2013; 4:13–20.
137. Zhang Y, Xu D, Li W, Yu J, Chen Y. Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEp-2 and Canine MDCK Cells. *J Nanomater.* 2012.
138. Sultana S, Djaker N, Boca-Farcau S, Salerno M, Charnaux N, Astilean S, Hlawaty H, de la Chapelle ML. Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology.* 2015 ;26:055101.
139. Favi PM, Gao M, Arango LJS, Ospina SP, Morales M, Pavon JJ, Webster TJ. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *J Biomed Mater Res Part A.* 2015; 00A:000-000
140. Bolat G, Kuralay F, Eroglu G, Abaci S. Fabrication of a polyaniline ultramicroelectrode via a self assembled monolayer modified gold electrode. *Sensors.* 2013; 13:8079–94.
141. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small.* 2011; 7:1322–37.

142. Liese A, Hilterhaus L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. Chem Soc Ver. 2013; 42:6236–49.

6. ANEXOS

Anexo 1

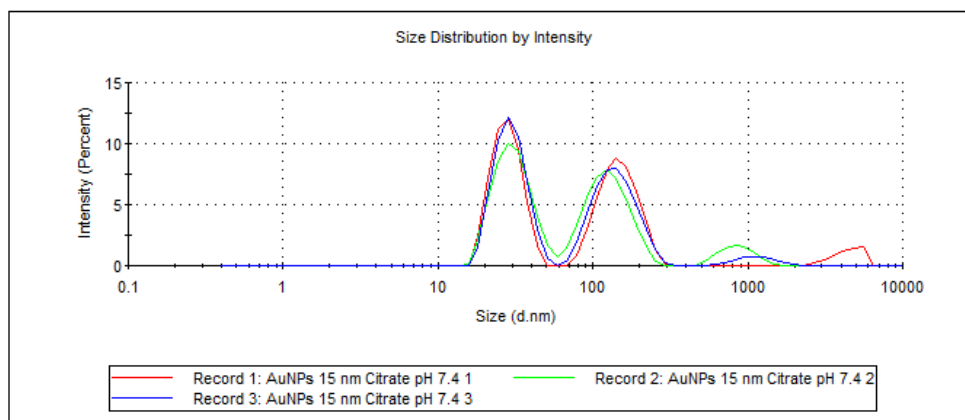


Figura 24. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 15 nm (Citrato) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS

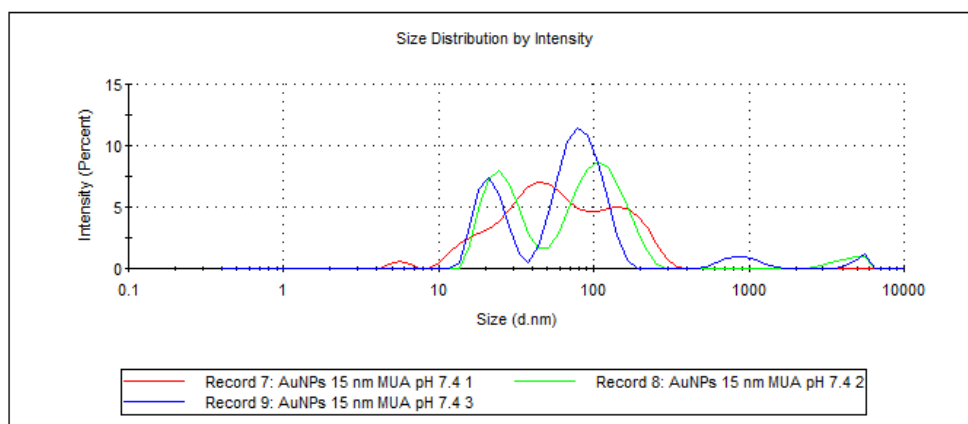


Figura 25. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 15 nm (MUA) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS.

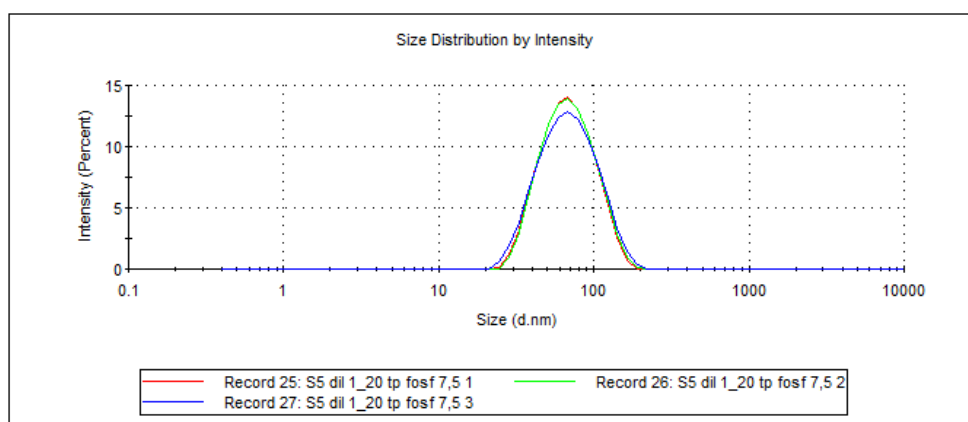


Figura 26 . Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 60 nm (Cittrato) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS.

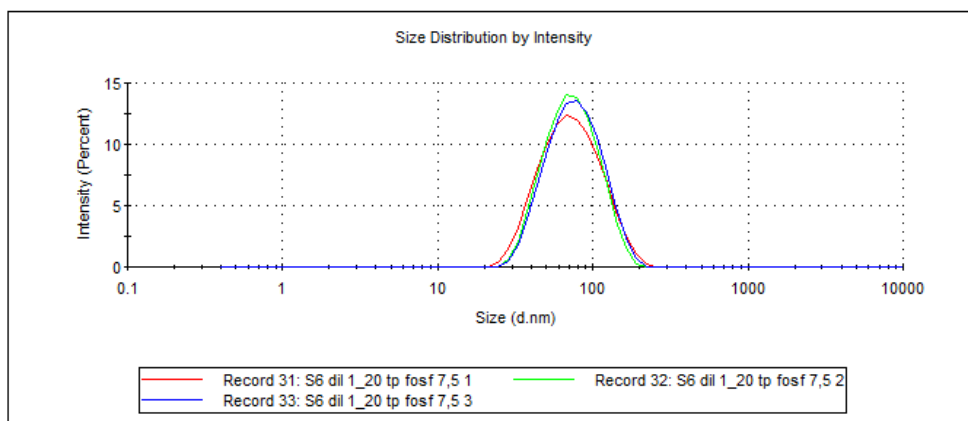


Figura 27. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Esféricas ≈ 70 nm (Citrato) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS.

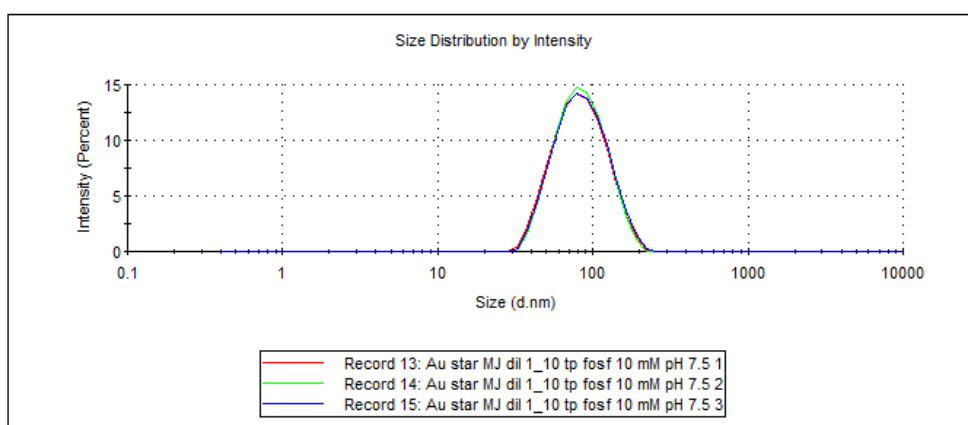


Figura 28. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Estrela ≈ 50 nm (A) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS.

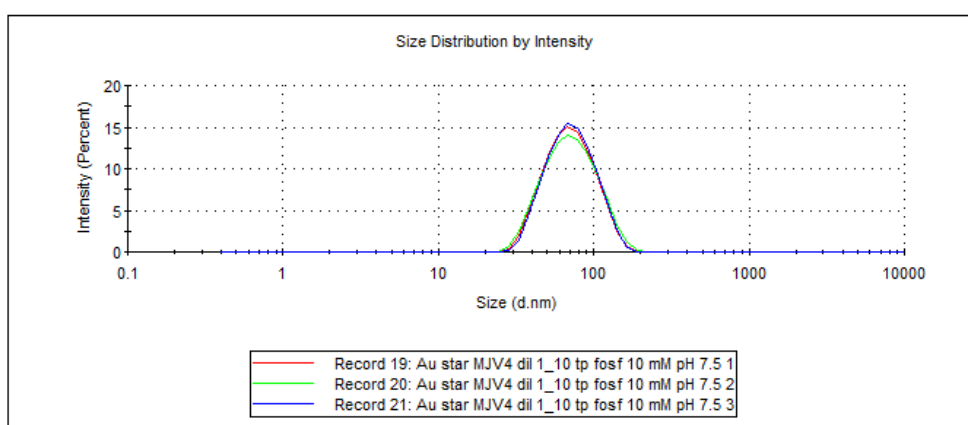


Figura 29. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Estrela ≈ 50 nm (B) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS.

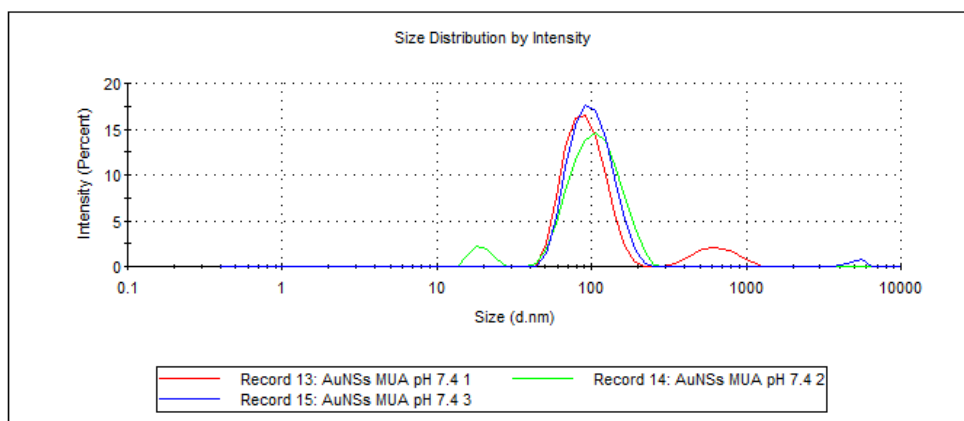


Figura 30. Gráficos de intensidade obtidos para as AuNPs Estrela ≈ 60 nm (C) na determinação do diâmetro hidrodinâmico por DLS.

Anexo 2

Tabela 5. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, das células HepaRG não diferenciadas após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.

		HepaRG não diferenciadas			
		MTT 4h	MTT 24h	NR 4h	NR 24h
Controlos	Negativo	100±0,68	100±0,57	99,97±0,27	100±0,68
	Citrato	101,1±1,29	98,7±1,6	98,33±0,72	99,92±1,36
	MUA	101,3±1,27	101,1±1	99,1±0,72	98,1±1,12
AuNPs esféricas 14,8±2,9nm (MUA)	60 µM	99,03±1,42	50,94±11,19	93,03±0,78	83,21±1,29
	40 µM	100,1±0,84	74,62±3,75	92,81±0,9	86,56±1,18
	20 µM	102,5±0,79	83,66±1,08	95,72±1,05	94,85±1,01
	10 µM	101,7±0,53	87,92±1,4	98,83±1,48	95,87±0,59
	5 µM	101,2±0,82	87,66±1,47	101,1±1,22	97,26±1,39
	1 µM	99,26±1,04	92,94±1,3	101,5±0,85	98,53±1,61
AuNPs esféricas 14,8±2,9nm (Citrato)	60 µM	95,88±0,79	89,49±1,04	92,2±1,5	90,05±1,57
	40 µM	98,88±0,65	88,26±0,92	95,48±1,58	92,09±1,6
	20 µM	100,1±1,06	90,06±1,13	97,27±0,49	93,02±1,71
	10 µM	101,6±1,18	89,88±0,68	98,79±1,05	93,03±1,38
	5 µM	99,95±1,17	93,94±0,38	99,03±0,95	93,11±1,21
	1 µM	102,6±1,57	95,61±1,24	99,73±0,99	95,24±1,3
AuNPs esféricas 58,47±6,93nm (Citrato)	60 µM	84,23±2,51	69,44±2,77	102,7±0,86	64,6±1,05
	40 µM	89,87±2,3	77,52±2,24	97,92±1,56	68,72±0,74
	20 µM	93,4±1,41	89,68±2,44	97,91±1,72	82,81±1,62
	10 µM	101,5±1,72	96,89±2,6	101,8±1,51	90,25±0,87
	5 µM	100,1±1,25	99,89±2,48	98,88±1,81	95,82±1,1
	1 µM	99,31±1,14	101±1,98	102,7±1,45	95,22±1,39
AuNPs esféricas 66,97±7,18nm (Citrato)	60 µM	86,65±2,51	63,58±4,67	100±1,15	57,05±3,77
	40 µM	92,99±2,08	84,21±3,69	99,65±1,51	80,06±1,19
	20 µM	97,9±1,43	90,31±2,19	101,9±1,52	91,49±2,99
	10 µM	96,45±0,66	100,3±3,22	102,1±1,61	100,6±1,99
	5 µM	100±1,9	101±2,53	101,5±2,37	102,2±0,91
	1 µM	98,47±2,15	100,6±0,83	103,9±1,34	99,11±0,85
AuNPs em forma estrela 54,31±12,35nm (MUA)	60 µM	99,68±1,92	82,25±4,58	102,4±2,15	67,85±1,06
	40 µM	101,7±1,57	94,44±3,39	99,34±1,36	82,17±1,22
	20 µM	98,03±1,32	96,6±1,64	101±1,25	82,2±2,02
	10 µM	96,65±1,6	102,7±1,54	99,71±1,43	90,64±1,21
	5 µM	101,2±1,17	103,1±1,13	100,2±2,24	90,28±1,01
	1 µM	99,49±0,97	101,4±0,99	98,39±2,05	95,21±1,46
AuNPs em forma estrela 56,03±12,52nm (MUA)	60 µM	96,05±1,49	77,46±4,31	102,2±1,21	60,24±3,31
	40 µM	97,92±1,6	95,96±3,26	99,21±1,36	76,23±0,99
	20 µM	98,91±1,84	101,4±3,09	97,45±1,43	86,83±1,34
	10 µM	97,81±1,58	101,4±0,95	95,04±2,08	101±1,53
	5 µM	99,28±1,02	100,6±0,72	95,91±1,61	99,6±1,25
	1 µM	101,8±2,33	102,8±0,72	99,06±1,33	101,2±1,03
AuNPs em forma estrela 71,8±15,5nm (MUA)	60 µM	85,68±2,15	67,39±0,37	94,99±1,55	95,24±1,11
	40 µM	85,83±2,55	68,51±0,68	100,8±1,11	92,82±1,54
	20 µM	82,9±1,41	70,15±0,73	101,8±0,92	91,87±1,79
	10 µM	84,84±1,92	75,66±0,95	100,4±0,84	91,2±1,62
	5 µM	88,21±1,63	78,13±0,54	101,7±0,42	91,48±1,19
	1 µM	92,64±0,8	88,78±1,08	100,2±0,41	93,05±1,23

Tabela 6. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, das células HepaRG diferenciadas após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.

		HepaRG diferenciadas			
		MTT 4h	MTT 24h	NR 4h	NR 24h
Controlos	Negativo	100±1,68	100,1±1,93	100±1,59	99,85±2,59
	Citrato	99,63±3,69	101,3±1,4	100,6±1,13	98,99±1,96
	MUA	102,5±1,21	101,3±0,93	100,9±0,76	99,72±1,46
AuNPs esféricas 14.8±2.9nm (MUA)	60 µM	92,8±3,43	66,82±7,41	89,77±3,92	87,71±3,31
	40 µM	90,58±3,55	93,98±0,45	95,54±3,9	81,23±4,06
	20 µM	99,39±1,61	97,02±0,99	96,67±3,05	84,81±2,53
	10 µM	101,4±1,63	100,5±1,62	100,8±0,61	99,59±1,34
	5 µM	100,7±1,8	103,2±2,74	100,8±1,55	99,8±1,34
	1 µM	107,5±2,29	108,3±2,16	101,6±0,9	102,6±1,18
AuNPs esféricas 14.8±2.9nm (Citrato)	60 µM	94,14±2,95	70,49±7,38	92,77±3,03	85,83±4,65
	40 µM	103±2,37	93,16±3,67	94,76±0,54	87,36±3,26
	20 µM	105,4±1,57	93,67±1,99	99,35±0,88	99,61±2,53
	10 µM	102,2±1,71	92,92±2,75	97,76±1,29	101,3±2,22
	5 µM	104,5±2,13	102,8±1,62	102,4±1,08	101,3±1,71
	1 µM	101,6±1,76	98,87±1,87	103±2,9	107,5±2,18
AuNPs esféricas 58.47±6.93nm (Citrato)	60 µM	90,74±2,47	76,25±3,53	93,83±0,83	95,87±0,68
	40 µM	101±3,06	83,45±3,68	95,95±1,99	92,45±0,87
	20 µM	101,4±2,46	84,44±3,08	100,5±1,09	95,13±0,93
	10 µM	98,6±0,65	89,28±2,68	98,89±1,02	96,69±0,64
	5 µM	97,46±1,3	88,24±2,59	100,7±0,94	95,14±0,51
	1 µM	99,48±0,67	97,08±2,19	99,53±0,96	98,13±1,04
AuNPs esféricas 66.97±7.18nm (Citrato)	60 µM	89,07±3,01	87,53±3,73	92,64±1,49	84,68±1,1
	40 µM	92,74±1,22	92,54±2,91	99±0,76	85,04±1,1
	20 µM	93,7±0,78	92,26±3,1	99,75±0,82	90,67±1,49
	10 µM	97,75±1,07	93,97±2,91	100,4±0,56	95,88±1,64
	5 µM	97,39±1,34	96,95±2,33	101,6±0,72	98,45±1,45
	1 µM	98,95±0,77	99,58±1,55	101,5±0,7	99,72±1,04
AuNPs em forma estrela 54.31±12.35nm (MUA)	60 µM	100,9±0,8	90,83±0,56	96,92±2,39	94,06±0,9
	40 µM	98,01±1,43	94,02±1,1	100±0,43	93,25±1,17
	20 µM	100,6±1,36	97,25±0,76	98,07±0,7	95,93±1,21
	10 µM	100,4±0,76	96,88±1,2	98,54±0,77	96,13±1,02
	5 µM	101±0,53	100±0,58	100,3±1,09	97,58±1,29
	1 µM	102,7±0,52	99,34±0,81	101,8±1,18	98,35±1,12
AuNPs em forma estrela 56.03±12.52nm (MUA)	60 µM	95,87±1,34	91,4±0,86	99,94±0,88	93,07±1,5
	40 µM	104,2±1,22	94,93±0,57	100,7±0,68	94,64±0,92
	20 µM	101,2±1,26	96,78±0,68	100,9±0,77	94,44±1
	10 µM	101±0,66	100±0,99	101,2±0,9	95,85±1,7
	5 µM	100,5±0,78	98,98±0,91	103,3±1,74	94,86±1,88
	1 µM	105,4±2,52	96,91±1,08	104±1,19	98,05±2,3
AuNPs em forma estrela 71.8±15.5nm (MUA)	60 µM	86,21±2,02	66,69±4,06	81,9±5,98	84,49±3,06
	40 µM	100,3±1,86	72,61±9,31	91,1±3,77	81,04±2,97
	20 µM	100,4±1,37	86,3±9,87	99,02±3,11	97,93±2,72
	10 µM	100,1±2,2	85,56±6,61	102,7±1,26	96,51±1,9
	5 µM	103,5±1,45	100±1,21	101,9±1,69	96,48±2,15
	1 µM	102,2±1,94	98,61±1,65	100,5±1,39	97,1±1,21

Tabela 7. Valores de viabilidade celular, em percentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, e percentagem de libertação de LDH para o espaço extracelular, das células Caco-2 após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.

		Caco-2					
		MTT 4h	MTT 24h	NR 4h	NR 24h	LDH 4h	LDH 24h
	Negativo	100,00± 0,69	100±0,55	100±0,47	100±1,21	0±0,5	0±0,18
Controlos	Citrato	99,15± 1,14	100,3±0,75	99,84±0,89	100±1,56	0,19±1,1	-0,21±0,33
	MUA	99,25± 0,92	101,7±0,68	100,2±1,18	99,86±1,43	-0,94±0,29	1,16±1,03
AuNPs esféricas 14.8±2.9nm (MUA)	60 µM	95,04 ±1,76	88,45±1,76	97,94±0,98	89,87±1,43	-1,54±0,32	0,88±0,87
	40 µM	93,30± 1,79	92,45±0,43	101,1±1,68	91,38±3,23	-2,45±0,34	3,85±1,96
	20 µM	94,07± 1,44	95,51±1,68	102,9±1,35	96,32±1,36	-2,33±0,4	3,29±2,21
	10 µM	100,3±1,54	94,51±1,14	102,2±1,66	97,88±3,5	-0,59±0,45	4,62±2,38
	5 µM	102,3± 1,50	97,62±1,36	103,1±0,73	102,9±1,28	-0,91±0,52	3,67±2,31
	1 µM	102± 1,13	97,01±0,72	102,1±1,70	101,3±2,04	-2,16±0,41	6,44±2,28
	1 µM	90,18 ± 0,73	92,97±1,10	96,24±0,98	84,74±4,34	5,14±1,76	5,76±0,67
AuNPs esféricas 14.8±2.9nm (Citrato)	60 µM	92,71 ± 1,43	91,42±1,28	98,49±1,87	92,16±2,01	0,59±1,13	4,93±0,64
	40 µM	4,93±0,64	91,76±1,18	101,1±1,67	90,57±5,29	-0,35±1,2	8,44±0,55
	20 µM	8,44±0,55	88,57±1,22	101,1±1,22	93,43±4,49	2,4±1,81	4,34±0,41
	10 µM	4,34±0,41	92,67±1,04	101,5±1,59	102,1±1,4	0,3±1,61	3,56±0,5
	5 µM	3,56±0,5	94,73±1,11	100,7±1,96	99,03±1,94	-1,41±1,28	3,58±0,36
	1 µM	3,58±0,36	88,17±1,82	99,17± 1,00	95,07±1,62	7,49±1,5	4,74±0,63
	1 µM	4,74±0,63	91,78±2,43	98,82±1,11	100,8±0,94	2,8±0,35	2,9±0,97
AuNPs esféricas 58.47±6.93nm (Citrato)	60 µM	2,9±0,97	98,85±1,25	95,05±1,62	99,31±1,02	0,97±0,39	2,33±0,57
	40 µM	2,33±0,57	99,99±1,16	96,42±0,89	101,1±1,04	1,54±0,36	1,12±0,25
	20 µM	1,12±0,25	99,15±1,14	96,61±0,98	100,2±1,13	2,13±0,2	1,99±0,79
	10 µM	1,99±0,79	98,99±1,06	98,47±1,09	99,89±1,25	1,9±0,19	1,31±0,45
	5 µM	1,31±0,45	87,07±2,31	98,36±0,94	95,35±1,08	-0,04±0,96	1,78±0,5
	1 µM	1,78±0,5	89,38±2,29	98,72±1,07	96,1±1,27	-0,29±0,57	-0,74±0,54
	1 µM	-0,74±0,54	97,18±1,82	99,16±1,32	97,38±1,67	-3,03±0,3	0±0,51
AuNPs esféricas 66.97±7.18nm (Citrato)	60 µM	0±0,51	99,41±0,60	97,31±1,45	98,87±1,44	-2,03±0,46	0,74±0,6
	40 µM	0,74±0,6	99,38±0,99	96,02±1,31	99,33±1,25	-3,2±0,72	1,97±0,35
	20 µM	1,97±0,35	97,85±1,02	96,87±0,93	99,79±1,89	0,18±0,82	2,04±0,42
	10 µM	2,04±0,42	93,8±1,26	98,77±1,41	99,28±0,96	5,8±4,27	22,35±5,38
	5 µM	22,35±5,38	99,09±0,96	98,62±1,68	99,8±1,29	6,32±4,69	14,9±4,98
	1 µM	14,9±4,98	98,63±0,83	97,26±1,73	96,9±2,2	7,66±6,06	12,31±4,42
	1 µM	12,31±4,42	102±0,82	97,01±1,51	99,05±1,13	3,85±4,38	9,12±3,54
AuNPs em forma estrela 54.31±12.35nm (MUA)	60 µM	9,12±3,54	99,04±0,82	95,65±1,67	98,6±1,36	12,42±4,49	12,39±3,14
	40 µM	12,39±3,14	102±0,63	96,94±1,19	95,11±1,39	-1,06±2,35	11,87±3,53
	20 µM	11,87±3,53	87,19±1,93	97,78±1,38	98,47±0,92	4,74±4,76	17,87±6,08
	10 µM	17,87±6,08	95,09±1,18	97,23±1,63	98,78±0,58	-4,34±0,45	11,71±4,11
	5 µM	11,71±4,11	97,63±0,97	97,09±1,04	98,64±0,8	-4,09±0,42	10,35±4,12
	1 µM	10,35±4,12	100±0,72	95,81±1,50	98,89±0,76	10,98±6,18	10,14±3,71
	1 µM	10,14±3,71	99,58±0,89	96,22±1,63	99,39±1,44	6,09±4,44	10,57±3,78
AuNPs em forma estrela 56.03±12.52nm (MUA)	60 µM	10,57±3,78	100,2±0,70	97,03±1,52	98,97±0,88	5,39±4,36	11,08±3,64
	40 µM	11,08±3,64	93,86±1,37	94,99±1,94	94,14±2,31	0,49±0,65	0,62±0,65
	20 µM	0,62±0,65	92,34±1,34	95,56±1,15	94,59±1,52	-2,1±0,36	4,36±2,37
	10 µM	4,36±2,37	93,94±0,60	97,73±2,05	94,4±1,56	-0,96±0,31	5,54±2,07
	5 µM	5,54±2,07	93,87±0,88	98,48±1,51	92,92±1,16	-1,05±0,29	5,63±2,04
	1 µM	5,63±2,04	94,08±0,89	98,68±2,11	96,3±1,53	0,92±0,54	6,38±1,62
	1 µM	6,38±1,62	96,36±0,50	97,58±2,41	98,46±3,01	0,59±0,83	4,58±1,72

Tabela 8. Valores de viabilidade celular, em porcentagem, determinados pelos ensaios de MTT e VN, dos hepatócitos primários de rato após incubação com os diferentes tipos de AuNPs.

		Hepatócitos primários de rato			
		MTT 4h	MTT 24h	NR 4h	NR 24h
Controles	Negativo	100±1,58	100±0,9	100±1,23	100±1,29
	Citrato	98,85±1,47	98,13±1,29	98,28±2,01	97,31±2,03
	MUA	98,4±1,76	101,1±2,2	98,51±1,22	98,5±2,37
AuNPs esféricas 14.8±2.9nm (MUA)	60 µM	73,81±1,84	72,23±1,81	92,14±3,46	69,81±5,66
	40 µM	79,36±0,41	64,81±4,57	91,37±3,7	78,92±4,75
	20 µM	79,44±1,42	71±1,62	87,04±2,94	76,6±5,77
	10 µM	79,13±1,76	76,91±2,83	97,9±2,72	57,09±4,01
	5 µM	77,09±1,55	82,09±2,9	98,11±2,92	80,47±3,28
	1 µM	87,56±1,29	90,45±3,28	100,1±4,62	86±3,44
AuNPs esféricas 14.8±2.9nm (Citrato)	60 µM	84,34±1,95	80,47±1,42	94,65±4,6	79,32±3,31
	40 µM	86,54±2,04	83,24±2,74	99,87±1,92	78,82±3,35
	20 µM	92,21±1,86	91,04±1,9	101,9±3,06	74,91±3,09
	10 µM	88,83±3,98	88,78±2,19	98,45±1,35	75,67±5,25
	5 µM	96,07±3,8	93,46±3,28	99,88±3,21	85,69±3,6
	1 µM	100,9±3,02	102,6±3,62	102±1,14	93,12±3,22
AuNPs esféricas 58.47±6.93nm (Citrato)	60 µM	73,5±2,95	74,2±1,71	88,19±2,6	82,1±3,12
	40 µM	85,88±1,93	79,05±1,95	91,04±2,86	86,98±3,56
	20 µM	83,3±1,16	89,55±1,88	93,79±3,35	91,31±2,28
	10 µM	81,6±4,32	91,98±1,76	90,63±2,45	94,21±1,69
	5 µM	92,91±1,69	94,15±1,66	94,2±1,75	97,64±5,96
	1 µM	102,7±1,34	96,03±0,81	97,1±2,05	101,4±3,01
AuNPs esféricas 66.97±7.18nm (Citrato)	60 µM	84,36±2,76	80,18±1,91	88,09±2,94	81,25±3,98
	40 µM	85,06±3,061	82,65±2,33	87,17±2,85	85,15±3,26
	20 µM	85,93±1,54	89,61±1,51	93,85±2,94	90,06±2,09
	10 µM	81,14±4,21	85,98±3,2	92,77±2,55	92±4,75
	5 µM	100,6±1,82	91,36±2,08	96,04±3,21	96,01±2,82
	1 µM	103,4±0,61	95,32±1,67	97,57±2,51	98,61±2,73
AuNPs em forma estrela 54.31±12.35nm (MUA)	60 µM	97,65±3,49	94,34±1,85	91,27±1,17	79,22±4,55
	40 µM	101,9±2,33	91,82±0,81	86,98±1,57	84,18±5,39
	20 µM	103,7±1,71	92,06±1,67	86,88±2,51	89,33±1,77
	10 µM	100,4±2,26	96±1,94	82,81±2,6	90,33±1,51
	5 µM	105,5±1,6	97,88±2,21	89,84±1,94	92,11±3,13
	1 µM	105,8±1,07	101±1,7	93,43±1,4	101,8±2,12
AuNPs em forma estrela 56.03±12.52nm (MUA)	60 µM	94,35±4,79	99,42±2,35	87,26±2,02	89,25±1,33
	40 µM	97,21±0,79	97,2±2,21	85,54±4,93	88,91±1,27
	20 µM	100,3±1,38	101,9±1,97	89,81±6,39	90,32±1,15
	10 µM	95,09±0,54	96,7±1,48	89,58±5,19	82,37±0,78
	5 µM	101,3±0,7	101,3±2,19	96,48±4,41	90,43±0,81
	1 µM	104,3±0,84	94,79±1,21	98,09±3,83	87,94±1,36
AuNPs em forma estrela 71.8±15.5nm (MUA)	60 µM	76,69±1,49	72,68±1,09	92,09±6,02	90,81±5,19
	40 µM	85,09±1,34	80,26±0,78	99,35±1,91	89,82±3,68
	20 µM	86,27±1,44	81,94±2,18	98,43±2,47	83,01±4,53
	10 µM	89,77±3,1	84,69±1,03	101,5±2,66	95,55±5,13
	5 µM	102,4±2,82	92,15±1,6	98,08±1,61	100,7±3,37
	1 µM	101,2±2,82	94,67±2,41	102,7±0,74	100,5±2,76

