

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO
ENGENHARIA DE PRODUÇÃO**

CAIO HENRIQUE DA SILVA ROSA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS
FOTOSENSIBILIZADORAS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA DE CÂNCER**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2021

CAIO HENRIQUE DA SILVA ROSA

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS
FOTOSENSIBILIZADORAS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA DE CÂNCER**

**Evaluation of the Efficiency of Photosensitizing Nanoparticles for Application
in Photodynamic Therapy of cancer**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Produção da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Dr. João Carlos Colmenero.
Coorientador (a): Prof. Dra. Dayane Batista Tada.



PONTA GROSSA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

	<p>Ministério da Educação UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ CÂMPUS PONTA GROSSA Departamento Acadêmico de Engenharia de Produção</p>	 UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
---	--	---

TERMO DE APROVAÇÃO DE TCC

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS FOTOSENSIBILIZADORAS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA DE CÂNCER

por

CAIO HENRIQUE DA SILVA ROSA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 11 de maio de 2021 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Produção. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. João Carlos Colmenero
Prof. Orientador

Prof. Dra. Claudia Tania Picinin
Membro titular

Prof. Dr. Evandro Eduardo Broday
Membro titular

Prof. Dra. Dayane Batista Tada
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

Dedico este trabalho à minha família, em especial a minha mãe Sebastiana e a Tia Cecília, pelo apoio incondicional. Também minha Tia Adeleusa, Tio Edwaldo e Juliana pelo acolhimento em Carambeí - PR, ao ser aprovado em Engenharia de Produção na UTFPR.

AGRADECIMENTOS

A minha jornada começou desde que sai de Paraibuna – SP e comecei a residir em São José dos Campos – SP (minha cidade natal), aos 12 anos, o que torna impossível agradecer a todos que me ajudaram a chegar neste exato momento. Portanto, desde já peço desculpas àqueles que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas de que sou eternamente grato.

Agradeço a Deus, Jesus e ao mestre Meishu-Sama; que através da leitura de seus ensinamentos sagrados, proporcionam diariamente o fortalecimento da minha fé, resiliência e clareza para seguir em frente e buscar meus objetivos.

Agradeço aos meus professores do CEPHAS que possibilitaram eu ser Técnico em Química. Ao meu colega de bancada André Rodolfo Cursino, que durante nossa formação técnica ensinou o significado de irmandade e indicou-me ao estágio no ICT-UNIFESP. E ao colega de bancada; hoje Mestre, João Rafael Silvério, que sempre me motivou a aprender sobre a área de Biotecnologia.

Sou muito grato especialmente a Dayane Batista Tada que me ensinou tudo o que eu sei hoje em relação a cultivo celular, por sempre estar disponível e disposta a me ajudar, que me proporcionou durante 1 ano e dois meses participar do seu projeto de pesquisa de Nanomateriais e Nanotoxicologia, me apoiou na minha decisão de fazer Engenharia de Produção na UTFPR, e neste final de curso não hesitou em me ajudar novamente. Não tenho palavras para expressar minha eterna gratidão.

Muito obrigado, em especial as alunas Fabiana Gomes Ferreira (mestranda PPG-Biotec UNIFESP) e Suellen Rosa dos Santos (Processo FAPESP: 2017/10947-6) do grupo de pesquisa, que através de seus experimentos, puderam me proporcionar os dados que eu utilizei no meu trabalho de graduação.

Não poderia esquecer do João Carlos Colmenero, com sua maestria, experiência e calma, aceitou desenvolver o presente trabalho, me motivando a não desistir. E deixar registrado também, o meu reconhecimento ao DAENP – Departamento de Engenharia de Produção, que me permitiu realizar o presente tema. Deixar também registrado minha gratidão a Regina Negri Pagani, pela motivação inicial, os professores Fabio Neves Puglieri e Aldo Braghini Junior por estarem sempre disponíveis. E por fim, aos meus colegas de sala que estiveram ao meu lado nos bons momentos e nos mais difíceis, muita luz e saúde na caminhada da vida.

Numa peregrinação, a cada passo, você está se aproximando de Deus

E a cada passo que dê em direção a ele, são dados dez passos dele em direção a você.

Quando a estrada termina e o objetivo é cumprido, o peregrino sente que viajou apenas de si para si mesmo, e o Deus que encontramos estava o tempo todo dentro de nós, ao redor de nós, conosco e ao nosso lado.

(Autor desconhecido).

RESUMO

DA SILVA ROSA, CAIO HENRIQUE. Avaliação da Eficiência de Nanopartículas Fotossensibilizadoras para aplicação em Terapia Fotodinâmica de Câncer. 70 f. TCC 2 (Bacharelado de Engenharia de Produção), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Ponta Grossa, 2021.

Apesar do contínuo desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de câncer, o avanço dessa terapia nas aplicações clínicas ainda é contido pelo baixo acúmulo do fotossensibilizador (FS) no tecido tumoral e pelo seu curto tempo de circulação sanguínea, seja pela sua desativação por biomoléculas ou pela sua baixa solubilidade no meio. A ligação de FS às nanopartículas (NPs) surgiu como uma ferramenta útil para superar essas limitações. As NPs apresentam maior penetração e retenção no tecido tumoral uma vez que esse tecido possui vasculatura irregular e poros maiores que os poros de tecidos normais. Além de melhorar o direcionamento tumoral, as NPs aumentam a eficiência terapêutica dos FS por protegê-los de desativações, evitar a agregação e por permitir o controle da sua fotoatividade. Por meio do estudo de Nanomateriais com foco em pesquisa básica com Nanopartículas e Análise Estatística aplicada a ensaios de Toxicologia, foi desenvolvida a avaliação de eficiência do efeito causado pela funcionalização de NPs de ouro (AuNPs) e de ouro/prata (AuAgNPs) com FS azul de metileno (MB) pelo parâmetro de citotoxicidade, nas condições de ausência e presença de irradiação em comparação ao uso de MB em solução. A citotoxicidade na presença e ausência de irradiação em 660 nm foi estudada em células de melanoma metastático murínico (B16-F10 Nex2). Para a análise dos dados obtidos foi aplicado o Teste de Hipóteses permitindo avaliar a diferença entre os valores médios de viabilidade celular apresentados pelo uso das amostras em diferentes concentrações e composição metálica das NPs. Os dados foram analisados com respeito ao efeito citotóxico e fotoativo (citotoxicidade na presença de irradiação). A conclusão da proposta de trabalho foi fundamentada pelo teste-t pareado com o auxílio do software linguagem R para determinar qual combinação de NP e MB apresentou menor efeito citotóxico e maior efeito fotoativo, sendo essa as AuNPs funcionalizadas com MB na combinação de 0,24 nM de NPs e 0,98 M de MB. Essa combinação resultou em 130% de viabilidade celular na ausência de irradiação e 92% de viabilidade celular na presença de irradiação (102 J/cm²).

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Nanopartículas. Fotossensibilizador. Teste de Hipóteses. Teste-t pareado.

ABSTRACT

DA SILVA ROSA, CAIO HENRIQUE. Evaluation of the Efficiency of Photosensitizing Nanoparticles for Application in Photodynamic Therapy of cancer. 70 f. TCC 2 (Bachelor of Production Engineering), Federal Technological University of Paraná (UTFPR). Ponta Grossa, 2021.

Despite the continuous development of Photodynamic Therapy for the treatment of cancer, the expansion of clinical applications is still limited by the low accumulation of photosensitizer (PS) in the tumor tissue and by its short blood circulation time, either by its deactivation by biomolecules or due to its low solubility in the medium. The coupling of PS to nanoparticles (NPs) has emerged as a useful tool to overcome these limitations. NPs present greater penetration and retention in the tumor tissue since this tissue has irregular vasculature and pores larger than the pores of normal tissues. In addition to the enhanced tumor targeting, NPs increase the therapeutic efficiency of PS by protecting them from deactivations, preventing aggregation and allowing their photoactivity to be modulated. This work focused on basic research with Nanoparticles and Statistical Analysis applied to Toxicology tests. The efficiency evaluation of the effect caused by the functionalization of gold (AuNPs) and gold / silver nanoparticles (AuAgNPs) with the PS methylene blue (MB) was performed by using the cytotoxicity parameter in the conditions of absence and presence of irradiation in comparison with the use of MB in solution. Cytotoxicity in the presence and absence of irradiation at 660 nm was studied in murine metastatic melanoma cells (B16-F10 Nex2). For the analysis of the obtained data, the Hypothesis Test was applied, allowing to evaluate the difference in the average values of cell viability obtained by using the samples at different concentration and metallic composition of the NPs. The data were analysed regarding the cytotoxic and photoactive effect (cytotoxicity in the presence of irradiation). The conclusion this work was supported by the t-test paired with the aid of the R language software to determine which combination of NP and MB had the least cytotoxic effect and the greatest photoactive effect, this being the AuNPs functionalized with MB in the combination of 0.24 nM of NPs and 0.98 M of MB. This combination resulted in 130% cell viability in the absence of irradiation and 92% cell viability in the presence of irradiation (102 J/cm²).

Keywords: Photodynamic Therapy. Nanoparticles. Photosensitizer. Hypothesis testing. Paired t-test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da funcionalização da nanopartícula com FS formando as NPs fotossensibilizadoras	18
Figura 2 – Escala comparativa de tamanhos de milímetros a nanômetros	24
Figura 3 – Esquema representando o funcionamento da seletividade de destruição tumoral pelas NPs fotossensibilizadoras	28
Figura 4 – Esquema de funcionamento do espectrofotômetro	32
Figura 5 – Interpolação do coeficiente de correlação de Pearson	36
Figura 6 – Fluxograma Geral do PPA em TFD	38
Figura 7 – Incubação	42
Figura 8 – Fluxograma Operacional	42
Figura 9 – Espectros de absorção UV-Vis das AuNPs após funcionalização com MB	54
Figura 10 – Espectros de absorção UV-Vis das AuAgNPs após funcionalização com MB	55
Figura 11 – Script linguagem R	56
Figura 12 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10 Nex2 incubadas com AuNPs, MB em solução e MB adsorvido (2,2 μ M) em AuNPs em diferentes concentrações na presença e ausência de irradiação	57
Figura 13 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10 Nex2 incubadas com MB em solução e adsorvido em diferentes concentrações nas AuNPs	59
Figura 14 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10 Nex2 incubadas com AuAgNPs na ausência de irradiação	61
Figura 15 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade de células incubadas com AuAg funcionalizadas com MB (2,2 μ M)	62
Gráfico 1 – Aplicações Terapêuticas da Nanotecnologia Brasileira	19
Equação 1 – Cálculo da absorbância (A = absorbância; I_0 = intensidade de luz incidida; I = intensidade de luz que passa pela amostra; ϵ = absorvidade molecular; b = caminho óptico (largura da cubeta que contém a solução); c = concentração)	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estatística do Câncer de Pele	16
Quadro 2 – <i>Valor-p</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABEPRO	Associação Brasileira de Engenharia de Produção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
EHS	<i>Environment, Health and Safety</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FURG-ICB	Universidade Federal do Rio Grande - Instituto de Ciências Biológicas
ICT-UNIFESP	Instituto de Ciência e Tecnologia da Unifesp - Campus São José dos Campos - SP
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LMNano	Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia
NANoREG	Consórcio europeu para regulação em nanomateriais
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDP	Projeto de Desenvolvimento de Produtos
PPA	Projeto de Pesquisa Avançada
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
REACH	Registration, Evaluation, Authorization (and Restriction) of Chemicals
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia
SisNANO	Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias
UFMG-ICB	Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNONEX- UNIFESP	Unidade de Oncologia Experimental

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
AuAgNPs	Nanopartículas de Ouro e Prata
α	<i>Alfa</i>
b	Caminho óptico
B16-F10 Nex-2	Células de Melanoma Metastático
C ₆ H ₈ O ₆	Ácido Ascórbico
C ₁₉ H ₄₂ BrN	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CTBA	Solução de Brometo de Cetiltrimetilamônio
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	<i>DeoxyriboNucleic acid</i>
ϵ	Absorvidade molecular
FS	Fotossensibilizador
HAuCl ₄	Ácido Cloroáurico
HAuCl ₄ .xH ₂ O	Ácido Cloroaurico Hidratado
HAuCl ₄ .3H ₂ O	Ácido Cloroaurônico
H ₀	Hipótese Nula
H ₁	Hipótese Alternativa
I	Intensidade de luz que passa pela amostra
I ₀	Intensidade de luz incidida
k	Médias populacionais
MB	<i>Methylene Blue</i>
MTT	Atividade Mitocondrial
NaOH	Hidróxido de Sódio
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	Citrato de Sódio dihidratado
NPs	Nanopartículas
PBS	Solução tampão (pH neutro)
ρ	Coefficiente de Correlação de Pearson
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RPMI 1640	Meio de Cultura para crescimento celular (B16-F10 Nex-2)
TFD	Terapia Fotodinâmica
UVA	Radiação ultravioleta (comprimento de onda de 315 a 400 nm)
UVB	Radiação ultravioleta (comprimento de onda de 280 a 315 nm)
UVC	Radiação ultravioleta (comprimento de onda de 100 a 280 nm)
UV-vis	Ultravioleta visível
¹ O ₂	Oxigênio singlete

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo geral	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
1.1.3 Justificativas	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 NANOMATERIAIS	23
2.1.1 Nanopartículas	23
2.1.2 Nanopartículas e Aplicações Terapêuticas	26
2.1.3 Nanotoxicidade.....	28
2.2 CÂNCER DE PELE MELANOMA.....	30
2.3 ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL.....	31
2.3.1 Espectrofotômetro para análise de absorvância	31
2.3.2 Cálculo de absorvância	33
2.4 ESTATÍSTICA APLICADA NA ANÁLISE DE DADOS	33
2.4.1 Teste de Hipóteses e Significância Estatística	33
2.4.2 Correlações Bivariadas	35
2.4.3 Objetivos da análise de correlação	36
2.4.4 Análise de diferença entre duas condições	36
3 METODOLOGIA	38
3.1 IMPLEMENTAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AVANÇADA (PPA)	39
3.1.1 Nanopartículas e Aplicações em Terapia de Câncer	39
3.2 LABORATÓRIO DE PESQUISA	40
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.3.1 Materiais e Equipamentos	40
3.3.2 Fluxograma Operacional	41
3.3.3 Protocolo de Cultura Celular	42
3.3.3.1 Quantificação Celular	44
3.3.3.2 Ensaio do MTT	44
3.3.3.3 Esterilização do material	44
3.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS (NPs)	45
3.4.1 Síntese das nanopartículas de Ouro (AuNPs).....	45
3.4.3 Síntese das nanopartículas de Ouro e Prata Core-Shell (AuAgNPs).....	45
3.4.3 Espectroscopia Uv-Visível das nanopartículas (AuNPs e AuAgNPs).....	46

3.4.4	Preparação dos ensaios de interação das NPs com MB.....	46
3.4.4.1	Avaliação da citotoxicidade das AuNPs.....	46
3.4.4.2	Avaliação da fotoatividade das AuNPs funcionalizadas com MB	47
3.4.4.3	Procedimento de análise dos resultados do efeito da concentração de AuNPs na fotoatividade do MB.....	48
3.4.4.4	Procedimento de avaliação do efeito do aumento da concentração de MB adsorvido nas AuNPs	48
3.4.4.5	Avaliação da citotoxicidade das AuAgNPs	49
3.4.4.6	Avaliação da fotoatividade das AuAgNPs funcionalizadas com MB	49
3.4.4.7	Procedimento de avaliação dos resultados da citotoxicidade das AuAgNPs	50
3.4.4.8	Procedimento de avaliação da fotoatividade de AuAgNPs funcionalizadas com MB.....	50
3.5	PROPOSTA DE ANÁLISE NA LINGUAGEM R	50
3.6	TESTE - <i>t</i>	52
3.7	PROCEDIMENTO DE INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	52
3.7.1	Teste- <i>t</i> <i>pareado</i> no presente problema.....	52
3.7.2	Primeira Hipótese	53
3.7.3	Segunda Hipótese.....	53
3.7.4	Terceira Hipótese.....	53
4	RESULTADOS DOS ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	54
4.1	INTERAÇÕES ENTRE NPs SINTETIZADAS E FOTOSSENSIBILIZADOR MB	54
4.2	LINGUAGEM R E <i>valor-p</i> APLICADO	56
4.3	AValiação DA CITOTOXICIDADE E FOTOATIVIDADE DE NPs Au FUNCIONALIZADAS COM MB	57
4.3.1	Avaliação do efeito da concentração de AuNPs na fotoatividade do MB.....	57
4.3.2	Avaliação do efeito do aumento da concentração de MB adsorvido na AuNPs	59
4.4	AValiação DA CITOTOXICIDADE E FOTOATIVIDADE DE NPs AuAg FUNCIONALIZADAS COM MB	60
4.4.1	Avaliação da citotoxicidade das AuAgNPs	60
4.4.2	Avaliação da fotoatividade de AuAgNPs funcionalizadas com MB	61
5	CONCLUSÃO	63
6	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A exposição excessiva ao sol é o principal fator de risco do câncer de pele e com o clima tropical que abrange vasta área do território brasileiro, esse risco é elevado já que a exposição das pessoas ao sol é mais constante. O espectro da radiação ultravioleta é subdividido em três faixas de comprimento de onda: UVA, UVB e UVC. Os raios UVA apresentam comprimentos de onda mais longos (315-400nm), gerando processos oxidativos. Já os raios UVB (280-315nm) são considerados responsáveis por danos diretos ao DNA, foto-imunossupressão, eritema, espessamento do estrato córneo e melanogênese. E por último, os raios UVC (100-280nm) foram associados à atividade carcinogênica e com o pico de absorção pelo DNA. Com a aceleração nos últimos anos da destruição da camada de ozônio, a incidência de radiação UVB e UVC tem se tornado mais intensa. Já a incidência dos raios UVA não depende da camada de ozônio; o que indica a causa do câncer de pele em indivíduos que se expõem com maior frequência ao sol (POPIM *et al.*, 2008).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer - INCA (2020) o câncer de pele melanoma tem origem nos melanócitos (células que produz a melanina, responsável pela cor da pele), sendo frequente em adultos brancos. Existe a possibilidade de o melanoma surgir em qualquer região do corpo (pele ou mucosas), por meio de manchas, sinais ou pintas. Em pessoas negras, geralmente aparece nas palmas das mãos ou planta dos pés. A Sociedade Brasileira de Dermatologia – SBD (2020) constatou que o câncer de pele corresponde por 33% em relação a todos os diagnósticos de câncer, sendo que desta doença, a cada ano, surgem cerca de 180 mil novos casos. A doença é provocada pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele, onde o melanoma é o tipo mais agressivo desta doença. Em estágios mais avançados, a lesão é mais profunda e espessa, o que aumenta a chance de se espalhar para outros órgãos (metástase) e diminui as possibilidades de cura.

O Quadro 1 abaixo apresenta os dados estatísticos do ano de 2020, com dois panoramas, com o diagnóstico de novos casos e a mortalidade; em relação ao gênero e sua respectiva porcentagem.

Quadro 1 – Estatística do Câncer de Pele

Panorama 1: Estatística de novos casos de Câncer de Pele (2020)			
Sexo	Número de casos	Total	Porcentagem (%)
Masculino	4.200	8.450	49,70%
Feminino	4.250		50,30%
Panorama 2: Número de mortes Câncer de Pele (2020)			
Sexo	Número de casos	Total	Porcentagem (%)
Masculino	1.038	1.791	57,96%
Feminino	753		42,04%

Fonte: Adaptado Instituto Nacional de Câncer - INCA (2020)

Os dados do INCA (2020) demonstraram que do total de novos casos há um equilíbrio na taxa do diagnóstico quanto ao gênero, porém há uma maior letalidade no sexo masculino, representando 57,96% do total de número de mortes pela doença; enquanto o sexo feminino possui uma taxa de 42,04% conforme exposto no Quadro 1.

O tratamento varia conforme a extensão, agressividade e localização do tumor, bem como a idade e o estado geral de saúde do paciente. Na maioria dos casos, o melanoma metastático não tem cura, por isso é importante detectar e tratar a doença o quanto antes. O tratamento do melanoma avançado evoluiu muito nas últimas décadas; hoje já é possível viver por mais tempo e com mais qualidade, controlando a doença em longo prazo. Outros tratamentos podem ser recomendados, isoladamente ou em combinação, para o tratamento dos melanomas avançados, incluindo quimioterapia, radioterapia e; tratamentos alternativos, como a Terapia Fotodinâmica (TFD). Na TFD, a aplicação de um agente fotossensibilizador (FS) na pele lesada é combinada com a exposição a luz de intensidade e comprimento de onda adequados para ativar o FS. Uma vez ativo, o FS é capaz de reagir com oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio (ROS) que são as principais responsáveis por induzir morte nas células. O fato do FS tornar-se ativo apenas sob irradiação minimiza os danos aos tecidos saudáveis e portanto, os efeitos colaterais (SBD, 2020).

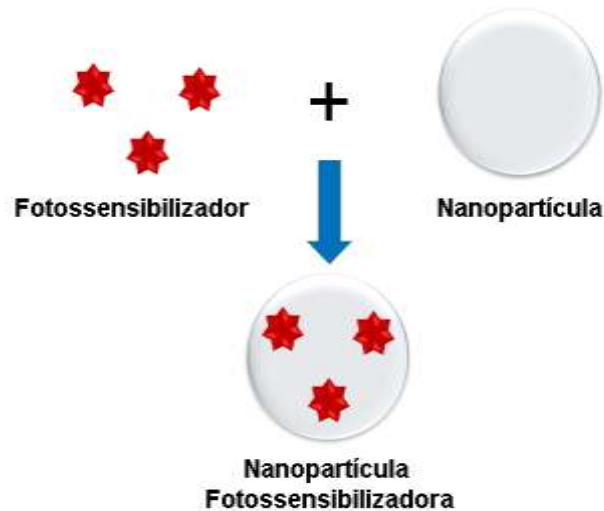
Nas últimas décadas, a TFD vem se destacando nas pesquisas na área da saúde, como opção para o tratamento do câncer de pele e outras doenças, utilizando substâncias fotoquímicas com alta afinidade pelo tecido tumoral. Assim, a TFD age nas células cancerosas, gerando principalmente o ROS oxigênio singlete (1O_2) após a ativação do FS. Porém, a hipóxia pré-existente em tumores e o consumo de oxigênio durante a TFD resultam em um suprimento de oxigênio inadequado, que dificulta a

eficácia fotodinâmica. Então a TFD depende da concentração de oxigênio molecular e da capacidade dos FS em transferir energia ao oxigênio dissolvido no tumor, com o risco de gerar também outras respostas tóxicas, sendo um entrave no uso clínico (CHENG *et al.*, 2015).

Segundo Sun *et al.* (2018) há muitos pontos que surgem como oportunidades na área para aprimoramento da TFD. Pesquisadores estão desenvolvendo métodos de otimização do mecanismo de entrega dos FS aos tecidos-alvo como forma de acelerar e diminuir o impacto das substâncias ativas no organismo, reduzindo a toxicidade em tecidos saudáveis e acelerando a eliminação dessas substâncias do organismo após o procedimento. Uma vertente de pesquisa nesta área é sobre o desenvolvimento e aplicação de nanopartículas (NPs).

NPs são materiais com uma das dimensões na escala nanométrica, normalmente, 1-100 nm, cujas propriedades físico-químicas são únicas e distintas do material em escalas maiores. Na terapia de câncer, NPs esféricas com diâmetros na faixa de 30-100 nm destacaram-se por apresentar maior penetração e permanência no tecido tumoral em detrimento de tecidos não tumorais. Essa propriedade é consequência da vasculatura irregular e sistema de drenagem linfática disfuncional do tecido tumoral. Moléculas pequenas como as de fármacos quimioterápicos podem transitar em todos os tecidos, mas NPs na escala mencionada apresentam maior dificuldade de transitar nos tecidos não tumorais diferentemente do que acontece nos tecidos tumorais, daí a maior seletividade desses materiais. Desta forma, NPs tem sido amplamente utilizadas para carreamento e entrega de drogas úteis na terapia de câncer. Na TFD, as NPs tem sido associadas aos FS, formando as NPs fotossensibilizadoras (Figura 1) e podem ser preparadas com diferentes materiais: metal, polímero, fosfolípidos e óxidos metálicos (TADA e BAPTISTA, 2015).

Figura 1 – Representação da funcionalização da nanopartícula com FS formando as NPs fotossensibilizadoras



Fonte: Aatoria Própria (2021)

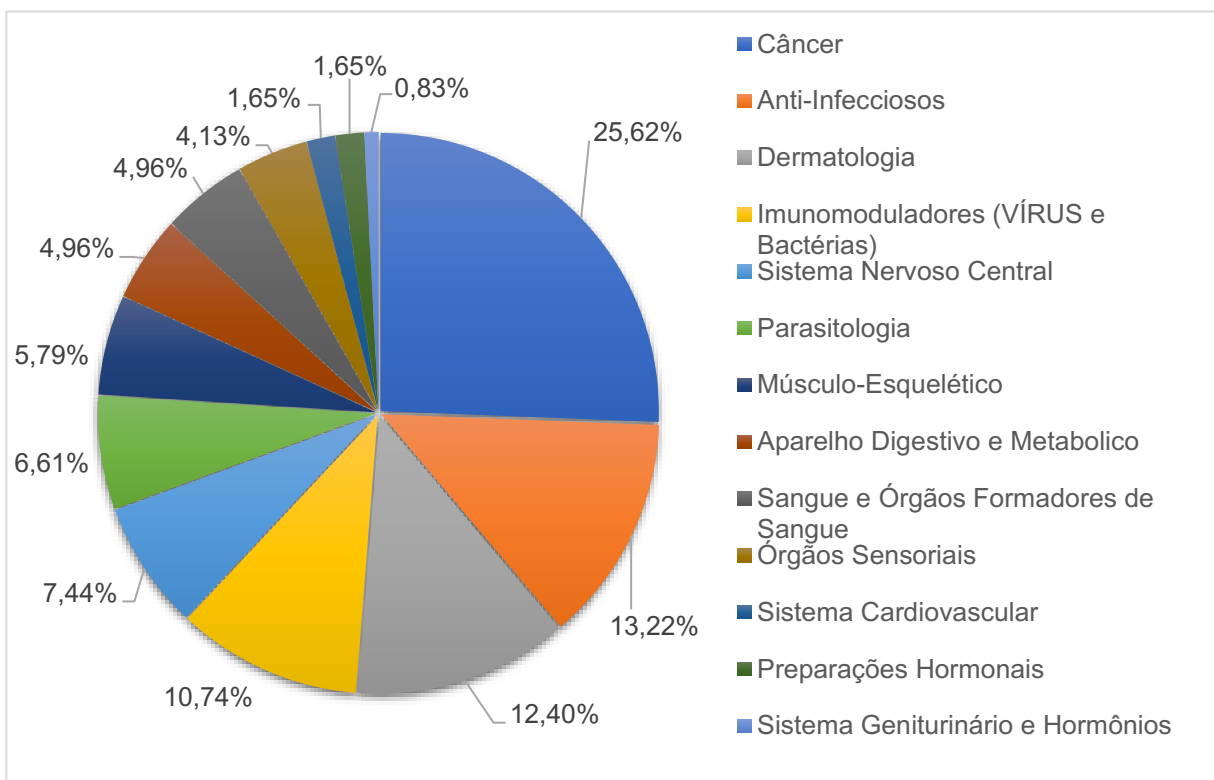
Pesquisas científicas recentes apontaram em ensaios clínicos, o potencial das NPs para aplicações biomédicas (HAMMOND, 2016). Além de sua utilização para auxiliar no diagnóstico de doenças por imagens (CHO *et al.*, 2017), diversos estudos demonstraram a capacidade das NPs em carregar moléculas de fármacos; reduzindo a exposição do corpo ao fármaco (SAFWAT *et al.*, 2016) e protegendo os fármacos da exposição ao meio externo (DAVIS; CHEN; SHIN, 2008). Ao mesmo tempo, uma vez que as NPs promovem o acúmulo dos fármacos preferencialmente em tumores sólidos (HAMMOND, 2016), elas permitem o uso de fármacos em concentrações mais baixas. Neste cenário, apesar da intensa pesquisa na área de NPs, poucos produtos estão no mercado; o que justifica a importância da área de pesquisa básica na linha de NPs aplicadas à saúde, para que os esforços e recursos disponíveis caminhem de forma concomitante com o desenvolvimento de produtos.

Projetos de Desenvolvimento de Produtos (PDP) são classificados por meio de diferentes critérios, tornando-se comum; por meio de novas descobertas de publicações científicas ou inovações, basear-se no grau de mudanças que o projeto representa em relação a projetos anteriores (como forma de melhoria contínua), pois a classificação depende das especificidades. Ao considerar-se Projetos de Pesquisa Avançada - PPA (dentro de PDP), o objetivo é criar conhecimento para projetos futuros. São projetos precursores do desenvolvimento comercial; com objetivos monetários de longo prazo, pois não se trata de um projeto de desenvolvimento de produto propriamente dito; e sim, de pesquisa avançada (ROZENFELD, 2006).

Segundo Rozenfeld (2006), os PDP podem ser conduzidos por meio de alianças ou parcerias entre instituições para criar diferenciação em relação aos demais projetos; ao tirar o foco no grau de mudança incorporado, e agregar no desenvolvimento fora do âmbito das instituições (para planejar estrategicamente e de forma conjunta o projeto de desenvolvimento, os quais possuem relevância e necessidades de recursos que são específicas, tais como: tecnologia, linhas de pesquisa, recursos humanos, entre outros). Assim, aumenta-se a eficiência nas atividades realizadas afim de obter um padrão adequado de inovação dos produtos, que não seja nem tão conceitualmente estático nem caoticamente dinâmico.

Atualmente a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de produtos no Brasil, utilizando Nanotecnologia em medicamentos para consumo humano; possui muitos depósitos de patentes que foram segmentados no trabalho de Giuriatti *et al.* (2019) de acordo com as aplicações terapêuticas, segundo os preceitos de classificação terapêutica da ANVISA. De acordo com Gráfico 1 abaixo, é possível notar que o Câncer é a aplicação terapêutica mais utilizada, contando em 25,62% dos depósitos de origem nacional.

Gráfico 1 – Aplicações Terapêuticas da Nanotecnologia Brasileira



Fonte: Adaptado (GIURIATTI *et al.*, 2019)

O desenvolvimento da Nanobiotecnologia aplicada à saúde; une de modo transdisciplinar a Biologia, Medicina, Química, Física, Engenharia e Informática; para desenvolvimento de sistemas nanométricos, tais como: NPs, nanossensores e nanossimuladores. A pesquisa na qual o presente trabalho se insere visa o desenvolvimento de NPs fotossensibilizadoras para aplicação em TFD de câncer, mais especificamente para tratamento de melanoma metastático. Essas NPs são preparadas utilizando um metal ou a combinação de dois metais e conjugadas a um FS, o azul de metileno (MB, do inglês *methylene blue*). O objetivo é alcançar maior fotoatividade pelo acoplamento eletrônico entre NP e FS além das vantagens inerentes ao uso das NPs conforme descrito em parágrafos anteriores. Deste modo, o foco desta pesquisa é entender se a associação do FS às NPs metálicas e bimetálicas pode proporcionar o aumento da fotoatividade (citotoxicidade na presença de irradiação) do FS e/ou se pode acarretar no aumento da citotoxicidade na ausência de irradiação. A resposta deste problema de pesquisa pretende subsidiar informações e conhecimentos para avaliar se existe correlação entre a concentração das NPs com o efeito tóxico observado em ensaios *in vitro* com células de melanoma metastático B16-F10 Nex2.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente Trabalho de Conclusão de Curso tem como objetivo geral realizar um estudo na área de Nanomateriais com foco em pesquisa básica com Nanopartículas e Análise Estatística aplicada a ensaios de Toxicologia. Por meio das habilidades em análises de dados e multidisciplinaridade do profissional de Engenharia de Produção, foi desenvolvido a avaliação de eficiência do efeito causado pela funcionalização de NPs de ouro (AuNPs) e de ouro/prata (AuAgNPs) com MB pelo parâmetro de citotoxicidade, nas condições de ausência e presença de irradiação em comparação ao uso de MB em solução.

1.1.2 Objetivos específicos

Para a execução deste objetivo foram estabelecidos os objetivos específicos:

- Definição das possíveis combinações NPs e MB que serão analisadas, concentração de NPs, composição de NPs (AuNPs e AuAgNPs) e concentração de MB;
- Caracterização das NPs funcionalizadas com MB e ensaios de viabilidade celular;
- Interpretação dos Resultados de Viabilidade Celular (%) *In Vitro* com o auxílio da linguagem R.

1.1.3 Justificativas

Segundo Monteiro (2020) a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem estabelecendo atividades multissetoriais, chamados de Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). As 17 ODS são um apelo global à ação para acabar com a pobreza, proteger o meio ambiente e o clima e garantir que as pessoas, em todos os lugares, possam desfrutar de paz e de prosperidade. A ODS3, visando assegurar vidas saudáveis e bem-estar para todos, em todas as idades, engloba objetivos, onde destacam-se o aumento substancial no financiamento da saúde e o recrutamento, desenvolvimento e formação de profissionais, e retenção do pessoal de saúde nos países em desenvolvimento, como no Brasil.

De acordo com a Associação Brasileira de Engenharia de Produção (ABEPRO, 2008), há diversas áreas do conhecimento relacionadas com a Engenharia de Produção tanto na Graduação, Pós-Graduação, Pesquisa e Atividades Profissionais. Entre as 10 grandes áreas da Engenharia de Produção, o presente trabalho está inserido na - Engenharia do Produto – que por meio de um conjunto de ferramentas e processos de projeto, planejamento, organização, decisão e execução envolvidas nas atividades estratégicas e operacionais de desenvolvimento de novos produtos, compreendendo desde a concepção até o lançamento do produto e sua retirada do mercado com a participação das diversas áreas funcionais da empresa, tendo o foco de aplicação nas subáreas de: Gestão, Planejamento e Processo do PDP; o qual no presente trabalho teve uma contribuição técnica na área da saúde; ao propor a combinação promissora dentre as estudadas de NPs fotossensibilizadoras para aplicação em TFD de melanoma metastático.

A nanotecnologia é baseada na utilização e ensaios de materiais em nanoescala, sendo tão pequenos que podem apresentar propriedades químicas,

físicas e interações biológicas diferentes daquelas existentes nas macroescalas; com aplicação em diversos setores da sociedade, o que exige a integração de diversas disciplinas, ou seja, trata-se de uma tecnologia que envolve o conhecimento de forma transdisciplinar e multidisciplinar. Assim tornou-se considerada a via para a resolução de muitos dos problemas complexos da atualidade, sendo justificado pelo aumento do número de artigos e patentes nas áreas de eletrônica e de medicamentos (BATISTA e PEPE, 2014).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção, é apresentada uma breve revisão das pesquisas realizadas por diferentes grupos de pesquisa na área de nanomateriais aplicados à saúde e publicados em livros e artigos científicos. Aqui, apresenta-se também o embasamento teórico afim de facilitar a compreensão do trabalho realizado. Esta seção está estruturada nos seguintes tópicos: “Nanomateriais”, “Câncer de Pele Melanoma”, “Espectroscopia Uv-visível” e “Estatística Aplicada na Análise de Dados”, para construir de modo sistemático a visão e entendimento do leitor sobre o presente tema.

2.1 NANOMATERIAIS

Nanomateriais são formados pela combinação de partículas ou aglomerados delas; com arranjos na disposição ou intervalo de tamanho na escala nanométrica, onde 1 nanômetro (1 nm) é igual a 1 bilionésimo de metro. A nanotecnologia (tecnologia que manipula de maneira controlada a matéria nessa escala) relaciona-se com nanomateriais manufaturados; projetados para apresentarem propriedades na escala de nanômetros. O meio ambiente sempre apresentou NPs naturais (cinzas vulcânicas, fios de teias de aranha ou fuligem), e a sociedade humana também contribui há muito tempo com NPs incidentais, produzidas como subprodutos não intencionais de outros processos (como as liberadas pelos escapamentos de automóveis ou derivadas da indústria). Com o desenvolvimento das metodologias de síntese, controle e caracterização de NPs manufaturadas, foi possível melhor monitorar a presença e o impacto das NPs naturais e incidentais. Portanto, o objetivo de manipular materiais na escala nanométrica é buscar propriedades e características que não poderiam ser obtidas de outra forma; ao validar a nanotecnologia como uma área do conhecimento, do que uma simples descrição de escala de medida (SCHULZ, 2013).

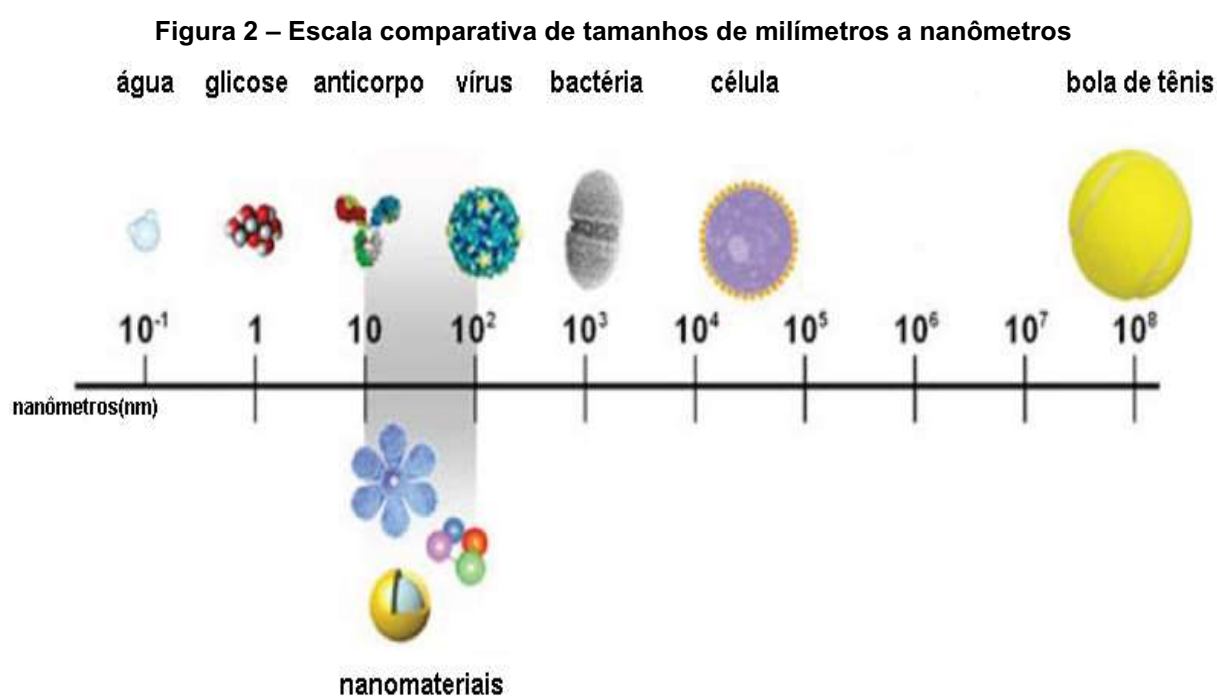
2.1.1 Nanopartículas (NPs)

As propriedades dos materiais em escala nanométrica apresentam-se de modo distinto ao compararmos com a escala macroscópica e microscópica; como por exemplo, a cor. A prata (Ag), possui cor metálica na escala macroscópica; sendo

escura quando microparticulada. Já na escala nanométrica torna-se amarelo-clara e adquire tons de verde quando começa a agregar. A coloração das NPs metálicas em suspensão é proveniente do acoplamento plasmônico da luz com o plasmon das NPs. O plasmon consiste na oscilação de elétrons nas NPs em função do dipolo do meio de constante dielétrica. O acoplamento plasmônico é característico de cada tipo de NP metálica e é responsável pelo aparecimento de novas cores nas NPs, muito distintas das cores dos metais da forma original. Por exemplo, as NPs de ouro em solução têm tonalidade avermelhada típica, sem o brilho dourado característico do ouro metálico (TOMA, 2016).

De acordo com Toma (2016) as NPs metálicas por apresentarem essa propriedade podem ser caracterizadas por espectrofotometria UV-vis usando um espectrofotômetro convencional. O espectro de absorção de luz irá apresentar tanto a absorção de luz como resultado da ressonância plasmônica quanto o espalhamento da luz. O máximo da banda espectral corresponde à condição de ressonância plasmônica e é característico da natureza da NP metálica, bem como da sua dimensão, geometria e estado de agregação.

Segue abaixo a Figura 2 (GOMES, 2013), para a compreensão ilustrativa e visual da escala nanométrica (nm) em que as NPs estão inseridas.



Fonte: Adaptado (GOMES, 2013)

As NPs ganharam novas perspectivas com o avanço da nanotecnologia; na capacidade de monitoramento e manipulação da matéria ao nível atômico molecular, fenômenos e conceitos da física clássica e quântica (TOMA, 2016).

Na verdade, o ser humano já manipulava a matéria a nível nanométrico desde a Idade Média, mas não conseguiam definir (devido a tecnologia da época) que os efeitos obtidos eram devidos à nanoescala. O exemplo clássico são os vitrais medievais; compostos com misturas de NPs metálicas, tal como de ouro, e de outros materiais de diversos tamanhos. Além da coloração, as NPs metálicas e de óxidos metálicos também funcionavam como purificadores de ar; devido ao efeito fotocatalítico (gerado pela incidência dos raios solares nos vitrais). Vale ressaltar que a nanociência não está somente ligada a conhecimentos químicos e físicos, como também está ligada a área biológica. A biologia e a bioquímica também apresentam um grande avanço da nanociência, pois o DNA, vírus e organelas são considerados nanoestruturas (FERREIRA, 2014).

Segundo Toma (2016) o uso de NPs nas últimas décadas em medicina, tornou-se um campo promissor tanto para o transporte quanto para a liberação controlada de fármacos e outras moléculas bioativas. Um dos obstáculos que as NPs mostraram-se úteis para vencer no desenvolvimento de novas drogas é a baixa solubilidade em água apresentada por algumas drogas promissoras com boa interação terapêutica com o alvo molecular. A solução nesses casos é encapsular essas drogas em NPs com uma superfície externa hidrofílica. Dessa forma, as NPs podem circular no meio biológico até encontrar o tecido a ser tratado. A superfície das NPs pode ainda ser modificada com moléculas capazes de evitar a adsorção de proteínas evitando o desencadeamento de resposta imune adversa.

A grande variedade de materiais que podem ser aplicados na síntese das NPs torna possível controlar a liberação do fármaco garantindo a eficiência terapêutica por tempo adequado. Além disso, a ligação de moléculas na superfície das NPs no organismo, fazendo com que essas cheguem primordialmente ao local desejado, evitando assim, efeitos colaterais em órgãos saudáveis, como, por exemplo, os provocados por quimioterápicos no tratamento do câncer. Assim, as NPs têm encontrado ampla aplicação na área de medicina podendo atuar como medicamentos, como carreadores e liberação controlada; sensores, agentes de contraste em imagem e diagnóstico clínico; procedimentos e implantes para engenharia tecidual e medicina regenerativa e em novos processos biotecnológicos, principalmente envolvendo

enzimas (TOMA, 2016).

2.1.2 Nanopartículas e Aplicações Terapêuticas

O câncer não é uma doença excepcional, ele varia de modo diferente em relação a outras doenças, com respostas distintas a terapias específicas. Há diferenças significativas no tratamento e no resultado em ações de combate, além da natureza complexa da doença; quando mutações genéticas constantes se manifestam inicialmente por meio de cânceres e se transformam em formas metastáticas recorrentes que são resistentes à terapia original. No meio acadêmico há um constante esforço em encontrar tratamentos mais eficientes, como a imunoterapia contra o câncer; incluindo o tratamento do melanoma, por exemplo. Muitas novas terapias em estudo são baseadas no uso das NPs, já que essas podem fornecer sistemas que respondem especificamente ao ambiente tumoral ou fornecer possibilidades de fármacos que agem de um modo sinérgico e efetivo em tumores resistentes; o que amplifica as possibilidades de drogas quimioterápicas promissoras. Novos meios de detectar a metástase combinam o diagnóstico ou imagem com a terapia; como por exemplo, a indução de atividade fototérmica de NPs usadas para carreamento e liberação do medicamento após o acúmulo no tumor (HAMMOND, 2016).

Segundo Csapó *et al.* (2012) NPs de metais nobres vem apresentando potenciais terapêuticos, sendo utilizados como biossensores em dispositivos ópticos e eletrônicos; com destaque para as NPs de ouro (AuNPs), que em aplicações biomédicas auxiliam diagnósticos e detecção *in vitro* e *in vivo*. Já as NPs bimetálicas, com as combinações Au@Ag, Au@Pd ou Au@Pt também apresentam aplicações na saúde, principalmente no campo da catálise (acelerando a velocidade de uma reação química), demonstrando melhor efeito catalítico do que seus homólogos monometálicos. A disposição dos átomos dos metais nas NPs bimetálicas está correlacionada com a preparação, como o evento de nucleação (tamanho e número de núcleos formados). Na área terapêutica, está claro que os nanomateriais de ouro e prata são promissores; mas em NPs de prata tem demonstrado alta toxicidade. No entanto, os efeitos interessantes das NPs de prata na cicatrização de feridas e, potencialmente, na amplificação dos efeitos das drogas anticâncer foram amplamente divulgados em revistas científicas. De modo geral, quando NPs metálicas são

expostas ao comprimento de onda de luz adequado, pode-se obter o efeito de fototermia, ou seja, sua temperatura aumenta rapidamente; induzindo uma extração fototérmica precisa para induzir morte de células no tecido tumoral (YAMADA *et al.*, 2015).

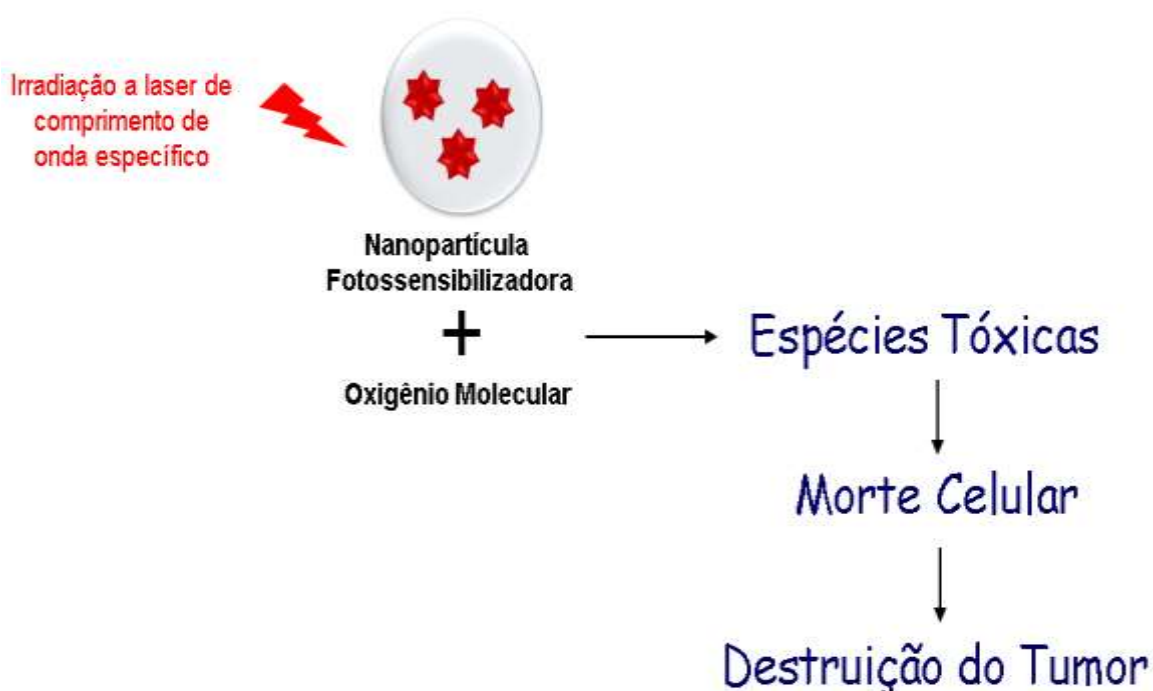
As NPs apresentaram também vantagens para a TFD. Khan *et al.* (2012) ressaltaram que a TFD não se limita apenas ao câncer e divulgaram seu trabalho sobre a TFD como uma alternativa ao tratamento convencional das infecções causadas por *C. albicans*; aliado aos efeitos fungicidas do FS (MB), que também se mostrou fototóxico contra o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Porphyromonas gingivalis*. No mesmo estudo, as AuNPs foram ressaltadas como uma potencial plataforma para carregamento de FS por suas propriedades relevantes, quando comparadas com outras NPs inorgânicas, como propriedades ópticas únicas de ressonância de plasmônica e uma superfície de bioconjugação para sondas moleculares; chamando a atenção da comunidade acadêmica para desenvolver um método totalmente diferente no campo da nanomedicina, seja no desenvolvimento de drogas antitumorais, acoplamento a anticorpos, antibióticos e outras drogas para matar seletivamente células doentes e microrganismos.

Dentre os FS disponíveis no mercado, o MB destaca-se por ser utilizado há várias décadas para aplicações clínicas. Além de possuir um preço de mercado acessível (MONTEIRO e VIADANA, 2009), é um corante sintético derivado de fenotiazina (TARDIVO *et al.*, 2005), possui uma natureza hidrofílica e baixa massa molecular (RAMALHO *et al.*, 2017). Essas características facilitam a sua utilização e vários estudos já demonstraram que a TFD utilizando o MB como FS é seletiva na destruição maciça de células malignas, com menor impacto em células não tumorais (TARDIVO *et al.*, 2005).

O MB também tem sido utilizado como ferramenta para eliminação de microrganismos relacionados a infecções endodônticas, pois interage predominantemente com macromoléculas de lipopolissacarídeos aniônicos, participando do processo de fotossensibilização (RAMALHO *et al.*, 2017). Apesar das grandes vantagens do MB, a sua susceptibilidade de sofrer desativação por biomoléculas e sua capacidade de induzir efeitos tóxicos mesmo na ausência de irradiação, ainda consistem nos principais empecilhos para o estabelecimento de seu uso em TFD de câncer. Assim, o uso de NPs para o carregamento de MB consiste em uma estratégia promissora para expandir seu uso em TFD. Além de proteger o MB de

desativação no meio biológico e aprimorar o acúmulo seletivo do MB no tecido tumoral, espera-se que ao funcionalizar as NPs metálicas com MB sua fotoatividade seja aprimorada por acoplamento eletrônico entre as NPs e as moléculas de MB. A Figura 2 esquematiza o funcionamento esperado para as NPs fotossensibilizadoras que podem ser formadas por exemplo pela funcionalização de NPs metálicas com MB para a seletividade de destruição do tumor.

Figura 3 – Esquema representando o funcionamento da seletividade de destruição tumoral pelas NPs fotossensibilizadoras



Fonte: Autoria Própria (2021)

2.1.3 Nanotoxicidade

Com o avanço da nanotecnologia e do uso de NPs em produtos comerciais, cresceu a preocupação com o impacto desses materiais na saúde e meio-ambiente. Muitos estudos que abordaram se o corpo pode eventualmente eliminar nanomateriais para evitar o acúmulo de partículas em tecidos ou órgãos foram publicados. No entanto, ainda há pouca compreensão das propriedades toxicológicas únicas das NPs e seu impacto a longo prazo na saúde humana; devido ao seu tamanho muito pequeno, são capazes de entrar no corpo humano por inalação, ingestão, penetração de pele ou injeções, com potencial de interagir com estruturas intracelulares e

macromoléculas por longos períodos. Atualmente, é consenso que a toxicidade das NPs depende muito da sua morfologia e química superficial. Materiais de mesma composição química podem apresentar novas propriedades toxicológicas com a alteração de sua escala micrométrica para nanométrica.

Em 2013, foi criada uma rede de colaboração sobre assuntos regulatórios de estudo e de informações sobre riscos de uso e manipulação de nanomateriais envolvendo países ao redor do mundo, chamada NANoREG. Em setembro de 2014, foi oficializada a participação do Brasil no projeto. A coordenação científica do projeto, pelo lado brasileiro, ficou sob responsabilidade do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), que atuou em conjunto com laboratórios integrantes do Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO), com as Redes de Pesquisa e Desenvolvimento em Nanotoxicologia e com pesquisadores da área. Laboratórios de oito instituições brasileiras contribuíram para cinco dos sete pacotes de trabalho propostos pelo NANoREG. São elas:

- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia INMETRO - coordenação científica do NANoREG Brasil;
- Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) - Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia (LMNano);
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Embrapa e Instrumentação (São Carlos) e Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora);
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Departamento de Farmacologia;
- Universidade de São Paulo (USP) - Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia;
- Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Instituto de Ciências Biológicas (ICB);
- Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Instituto de Ciências Biológicas (ICB);
- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Departamento de Química Inorgânica NanoBioss/Instituto de Química.

O programa do NANoREG terminou em 2017 e um de seus resultados foi um documento que pode ser usado como um guia para um entendimento comum no campo da avaliação de segurança e saúde ambiental (EHS) de nanomateriais dentro da estrutura regulatória europeia atual focada no REACH (*Registration, Evaluation,*

Authorization (and Restriction) of Chemicals), em que as substâncias químicas comercializadas na Europa e outros continentes, devem na maioria dos casos, serem registradas na ECHA (*European Chemicals Agency*), por exemplo, para demonstrar sua utilização segura. De acordo com as características próprias dos materiais, qualquer substância pode estar sujeita à autorização ou restrição, o que contribui para facilitar sua implementação. Fornece detalhes sobre o desenvolvimento, teste e validação de abordagens, como *Safe-by-Design* (desenhar o produto para ser seguro, e não testar o produto para depois analisar sua segurança), priorização nanoespecífica e avaliação de risco e análise do ciclo de vida (GOTTARDO *et al.*, 2017).

2.2 CÂNCER DE PELE MELANOMA

O câncer de pele do tipo melanoma tem baixa incidência e alta letalidade, ao desenvolver repercussões mais graves para os pacientes, podendo levar à morte. O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele, com prognóstico muito ruim quando há metástases no diagnóstico clínico. Há também maior risco quando já houve na história pessoal ou familiar casos de melanoma, além da exposição esporádica e intensa ao sol com conseqüente queimadura solar em mais de um episódio (COSTA, 2012).

O melanoma é formado por disfunção de nervos de um único melanócito localizado na base da epiderme. A vascularização do tumor acontece naturalmente por meio da difusão passiva onde as células tumorais obtêm todos os nutrientes necessários para crescer até atingir a faixa de tamanho de 2 mm³. Caso as células tumorais sejam maiores que 2 mm³ ocorre a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos para fornecer nutrientes suficientes às células cancerosas), o que aumenta a massa do tumor quando essas áreas se tornam ricamente vascularizadas (NAVES *et al.*, 2017).

De acordo com Santos (2017) as proliferações melanocíticas (células malignas, pigmentadas e com bordas irregulares) crescem e espalham-se com pouca repressão através da epiderme e derme. Esse crescimento irrestrito gera uma lesão de aparência aleatória e desorganizada (com variação na forma, coloração e características superficiais). Microscopicamente, essas células crescem como ninhos malformados, onde a natureza e a extensão do crescimento vertical é que vai

determinar o comportamento biológico do melanoma. O melanoma é detectado pelo paciente em 50% dos casos e os sinais relatados como alterações na coloração, tamanho e formato, com presença de irritação ou coceira, são os mais comuns e em sua maioria os primeiros sintomas. A utilização de algoritmos de reconhecimento é recomendada, incluindo a utilização do ABCDE do Melanoma (Assimetria, Borda, Cor, Diâmetro e Evolução). Por fim, não há uma terapia padrão para o tratamento do melanoma metastizado. Dentre as opções, existe a cirurgia (ação paliativa da doença local, porém não identifica metástases microscópicas), a quimioterapia (geralmente não é eficaz para o melanoma, mas pode aliviar os sintomas ou prolongar a sobrevivência em alguns pacientes), a radioterapia (quando a doença já atingiu a metástase cerebral, sendo uma opção em casos de lesões inoperáveis em que a radiação é controlada em regiões específicas e a crioterapia (utilização de nitrogênio líquido na liberação de um antígeno tumoral através de um trauma local na área e com isso possui um potencial de provocar uma resposta imune sistêmica anti-melanoma).

2.3 ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL

A Espectroscopia UV-Visível é uma técnica que estuda o fenômeno absorção da radiação eletromagnética pela matéria, nas regiões visível e ultravioleta do espectro de luz (onde as radiações do UV-Visível causam transições eletrônicas dentro das moléculas no caminho óptico do feixe de luz do aparelho, com comprimentos de onda na faixa de 200 à 800 nm). Deste modo, ao medir a absorbância da solução que está sendo analisada, é possível mensurar a capacidade do material em absorver radiação em um determinado comprimento de onda específico. Segundo Skoog *et al.* (2015) em estudos espectroscópicos, uma fonte deve gerar um feixe de radiação que seja suficientemente potente para fácil detecção e quantificação.

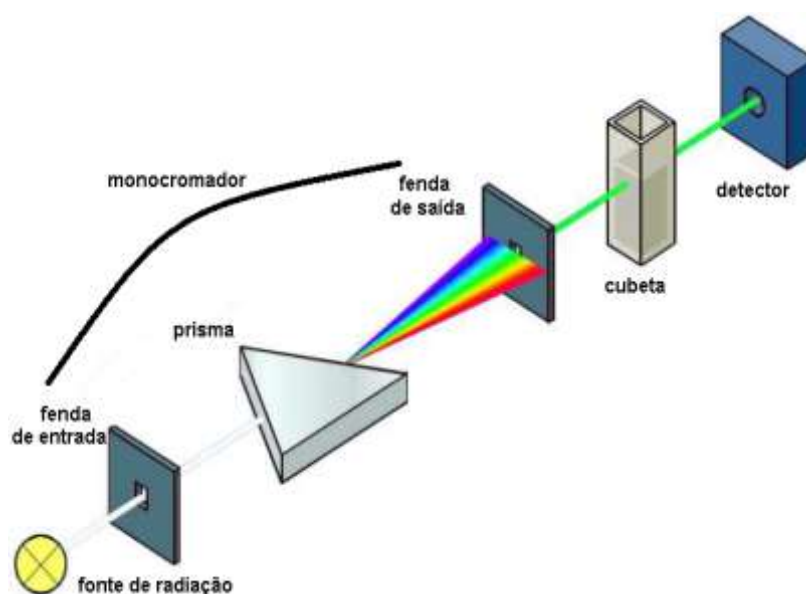
2.3.1 Espectrofotômetro para análise de absorbância

O espectrofotômetro possui uma fonte de luz branca, na qual todos os comprimentos de onda estão presentes, assim, esses comprimentos de onda, constituídos por fótons, passam pela amostra e causam transições eletrônicas

moleculares. Após isso, o detector recebe os fótons de todos os comprimentos de onda que não foram absorvidos pela amostra. Pelo cálculo da relação entre a intensidade de luz (proporcional ao número de fótons) que foi incidida na amostra e intensidade de luz que foi captada pelo detector, é gerada uma curva de absorbância em função do comprimento de onda da luz (MATSUSHITA, 2014).

Esse processo interno do espectrofotômetro pode ser observado na figura abaixo (SPUDEIT, 2009).

Figura 4 – Esquema de funcionamento do espectrofotômetro



Fonte: Adaptado (SPUDEIT, 2009)

Segundo Spudeit (2009) o equipamento espectrofotômetro registra o espectro da referência e em seguida o da amostra. Este consiste basicamente em uma fonte luz (fonte de radiação), onde normalmente usa-se lâmpada de deutério e tungstênio, sendo a primeira para a região do UV e a segunda para a região do visível. Outra parte de um espectrofotômetro é o monocromador (fenda de entrada, prisma e fonte de saída). São destinados a selecionar faixas do espectro de emissão de luz. Após passar pelos monocromadores o feixe de luz incide na amostra que está em uma cubeta (de quartzo ou vidro, porém a de vidro só pode ser utilizada para análises na região do visível, pois absorve na região do UV). E o último componente, o detector (com a possibilidade de empregar um – monocanais - ou vários detectores - multicanais).

2.3.2 Cálculo de absorvância

Segundo Canassa *et al.* (2019) um aspecto importante no cálculo da absorvância é a determinação da quantidade de luz que é absorvida pela amostra. Isto é descrito pela Lei de Lambert-Beer, que correlaciona a intensidade de luz que é incidida na solução (I_0), e a intensidade da luz que sai da solução (I), mostrando que a absorvância é diretamente proporcional à concentração da amostra. Assim, a absorvância (A) é calculada pela equação 1:

Equação 1 – Cálculo da absorvância (A = absorvância; I_0 = intensidade de luz incidida; I = intensidade de luz que passa pela amostra; ϵ = absorvidade molecular; b = caminho óptico (largura da cubeta que contém a solução); c = concentração)

$$\text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right) = A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Fonte: (CANASSA *et al.*, 2018)

2.4 ESTATÍSTICA APLICADA NA ANÁLISE DE DADOS

A partir da observação inicial, teorias relevantes são consultadas para gerar explicações (hipóteses) sobre a observação, a partir das quais se torna possível fazer projeções para planejar de forma otimizada experimentos. Para testar as previsões, necessita-se de dados (FIELD, 2020).

Anderson *et al.* (2019) concluíram que os gestores vêm reconhecendo que os dados podem ser extremamente valiosos para compreender situações e cenários que exigem tomadas de decisão orientadas. Existe uma ampla gama de técnicas para apoiar essas decisões baseadas em dados, sendo conhecida como *Analytics*; o processo científico para transformar dados em entendimento para tomar a melhor decisão e desenvolver *insights*, que melhora nossa capacidade de prever com mais precisão o planejamento, ajudando-nos a quantificar os riscos e gerando alternativas melhores por meio da análise.

2.4.1 Teste de Hipóteses e Significância Estatística

A hipótese estatística é uma estimativa para determinado parâmetro de análise em uma população, tais como: média, desvio-padrão, coeficiente de correlação, entre

outros. O teste de hipótese é uma técnica para a decisão sobre a veracidade ou falsidade de determinada hipótese. Para que uma hipótese estatística seja validada ou rejeitada com convicção, deve-se examinar toda a população, o que na prática se torna impossível. Por esse motivo, cria-se como alternativa viável, extrair uma amostra aleatória da população de interesse. Como a decisão é tomada com base na amostra, podem ocorrer erros como rejeitar uma hipótese quando ela for verdadeira ou não rejeitar uma hipótese quando ela for falsa (FÁVERO e BELFIORE, 2017).

No desenvolvimento de pesquisas ou estudos de casos, muitas vezes avalia-se, por meio de algum meio; a probabilidade de que a amostra de interesse selecionada seja um retrato fiel da população, tendo como estratégia diminuir a probabilidade de erro. Por meio de testes estatísticos obtém-se um auxílio na avaliação dessa tomada de decisão. O objetivo do teste estatístico é determinar uma probabilidade denominada *valor-p* (DANCEY e REIDY, 2019).

Segundo Montgomery e Runger (2016) a abordagem do *valor-p* tem sido muito utilizada na prática, pois é a probabilidade de que a estatística de teste assumirá um valor que é, no mínimo, tão extremo quanto o valor observado da estatística, quando a hipótese nula (H_0) for verdadeira. Assim, é possível afirmar que; o *valor-p*, é o menor nível de significância que conduz a rejeição de H_0 com os dados do problema. Portanto, o *valor-p* carrega muita informação sobre o peso da evidência contra a hipótese nula; logo, quem for tomar a decisão pode tirar uma conclusão com qualquer nível especificado de significância.

Segundo Fávero e Belfiore (2017) o procedimento para a construção dos testes de hipóteses envolve os seguintes passos:

- Passo 1: Escolher o teste estatístico adequado, dado o intuito do pesquisador;
- Passo 2: Apresentar a hipótese nula H_0 e a hipótese alternativa H_1 do teste;
- Passo 3: Fixar o nível de significância α ;
- Passo 4: Calcular o valor observado da estatística do teste com base na amostra extraída da população;
- Passo 5: Determinar a região crítica do teste em função do valor de α fixado no passo 3.

Atualmente, a abordagem convencional é de relatar o valor exato da probabilidade de uma dada estatística (o *valor-p*) e deixar de lado a questão de pensar nos resultados da análise. É recorrente artigos relatarem resultados como *significativos* ou *não significativos* e na literatura é comum utilizar o nível de 5% como

uma probabilidade aceitável devido ao erro amostral. Desse modo, caso se encontre um valor-p que seja menor do que 5% terá uma confiança razoável de que esse resultado corrobora a hipótese. Sendo *Alfa* (α) o critério de significância estatística que fixamos em nossas análises, a probabilidade que utilizamos como um ponto de corte, abaixo do qual assume-se que nosso resultado é improvável de tornar nossa hipótese de pesquisa mais plausível do que a hipótese nula (DANCEY e REIDY, 2019).

Os testes de hipóteses dividem-se em paramétricos e não paramétricos. Quando as hipóteses forem formuladas sobre os parâmetros da população, o teste de hipótese é chamado de paramétrico. Nos testes não paramétricos, as hipóteses são formuladas sobre características qualitativas da população (não se aplicando ao presente trabalho). Portanto, segundo Fávero e Belfiore (2017), os métodos paramétricos aplicam-se para dados quantitativos e exigem suposições fortes para sua validação listadas abaixo:

1. As observações devem ser independentes;
2. A amostra deve ser retirada de populações com determinada distribuição, geralmente a normal;
3. As populações devem ter variância iguais para testes de comparação de duas médias populacionais emparelhadas ou k médias populacionais ($k \geq 3$);
4. As variáveis em estudo devem ser medidas em escala intervalar ou de razão, de modo que seja possível utilizar operações aritméticas sobre os respectivos valores.

2.4.2 Correlações Bivariadas

Segundo Dancey e Reidy (2019) denomina-se o relacionamento entre duas variáveis de correlação bivariada. Se as duas variáveis são associadas, pode-se dizer que são correlacionadas. Isso significa que co-variam: quando os valores em uma variável mudam, valores na outra variável também mudam, de maneira previsível. Em outras palavras, as duas variáveis não são independentes. Um relacionamento correlacional não pode ser considerado como se sugerisse causalidade. Portanto, às vezes duas variáveis são relacionadas estatisticamente, mas não existe uma real associação entre elas.

2.4.3 Objetivos da análise de correlação

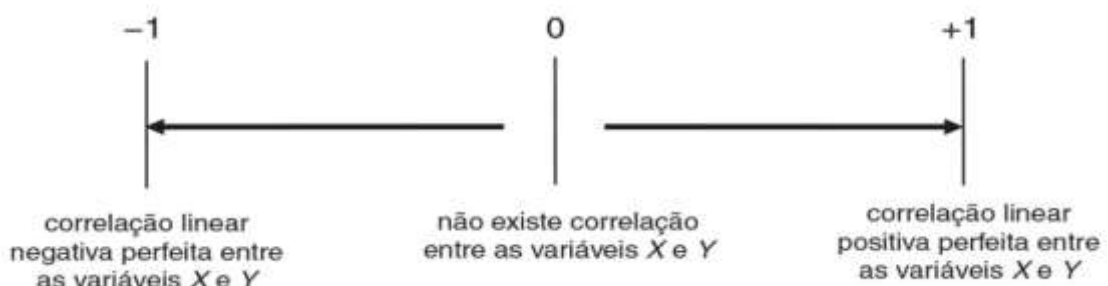
Segundo Fávero e Belfiore (2017) a análise bivariada tem como objetivo estudar relações (associações para variáveis qualitativas e correlações para variáveis quantitativas) entre duas variáveis. As relações podem ser estudadas por meio da distribuição conjunta de frequências, representações gráficas ou por meio de medidas-resumo. Quando são duas variáveis quantitativas, utiliza-se tabelas de distribuição conjunta de frequências, representações gráficas, como o diagrama de dispersão, além de medidas de correlação, como a covariância e o coeficiente de correlação de Pearson.

Segundo Fávero e Belfiore (2017) o coeficiente de correlação de Pearson (ρ) é uma medida que varia entre -1 e 1. Por meio do sinal, verifica-se o tipo de relação linear entre as duas variáveis analisadas (direção em que a variável Y aumenta ou diminui em função da variação de X); quanto mais próximo dos valores extremos, mais forte é a correlação entre elas. Portanto:

- Se ρ for positivo, existe uma relação diretamente proporcional entre as variáveis; se $\rho = 1$, tem-se uma correlação linear positiva perfeita;
- Se ρ for negativo, existe uma relação inversamente proporcional entre as variáveis; se $\rho = -1$, tem-se uma correlação linear negativa perfeita;
- Se ρ for nulo, não existe correlação entre as variáveis.

A figura abaixo ilustra a interpretação da escala do coeficiente de correlação.

Figura 5 - Interpretação do coeficiente de correlação de Pearson



Fonte: Manual de análise de dados: estatística e modelagem multivariada com Excel, SPSS e Stata, 2017.

2.4.4 Análise de diferença entre duas condições

Segundo Dancey e Reidy (2019) a análise de duas condições inclui os

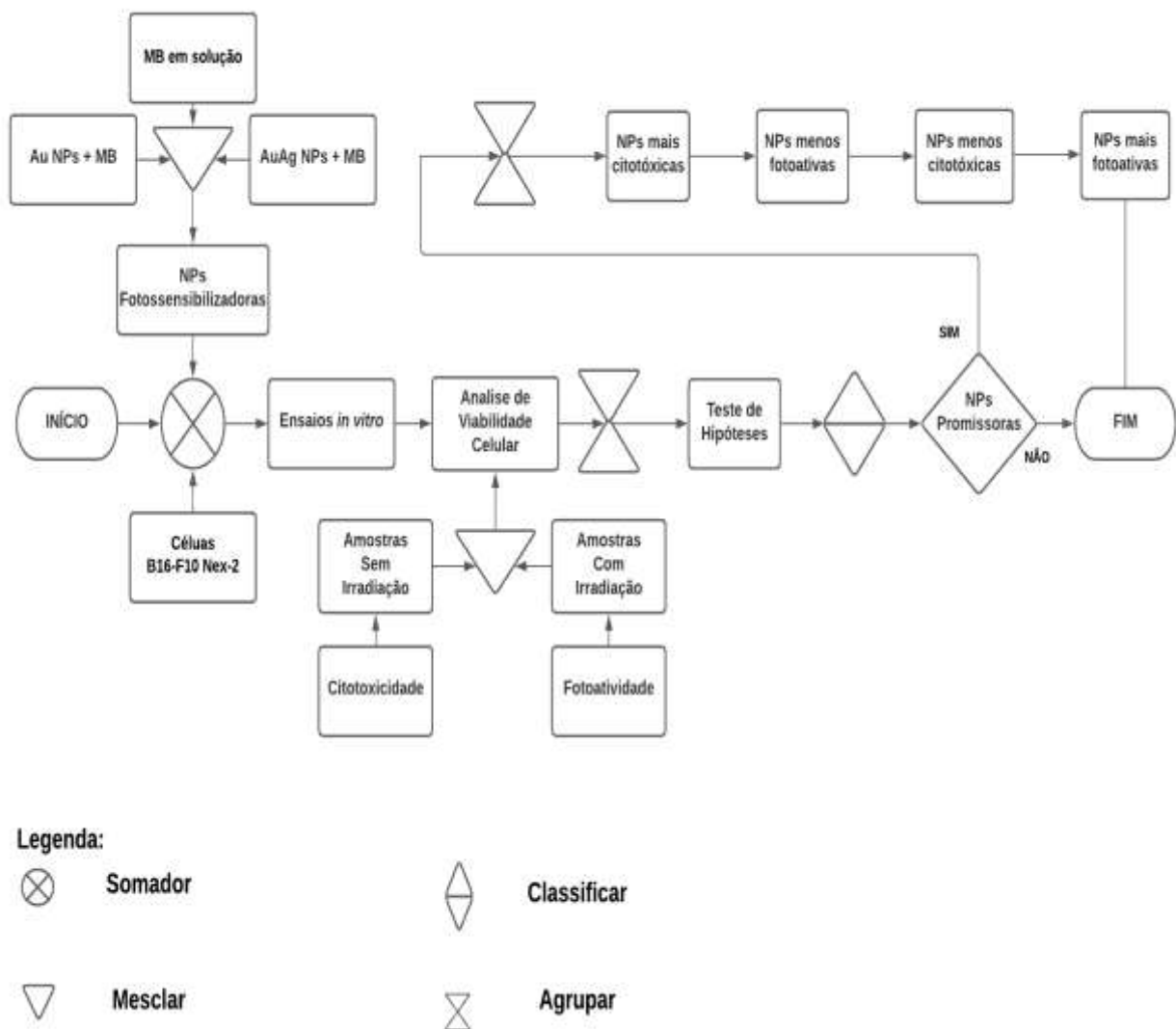
seguintes passos:

1. *Estatística descritiva*: como médias e medianas, desvios-padrão; intervalos de confiança em torno da média de ambos os grupos separadamente, quando apropriado; representações gráficas tais como os diagramas de caixa e bigodes e de barras de erro;
2. *Tamanho do efeito*: uma medida do grau no qual diferenças em uma variável dependente são atribuídas à variável independente;
3. *Limites de confiança*: em torno da diferença entre as médias;
4. *Teste inferenciais*: teste-t que determinam a probabilidade com que a diferença entre as condições possa ser atribuída ao erro amostral assumindo que a hipótese nula seja verdadeira.

3 METODOLOGIA

No presente t3pico, ser3 descrito o Projeto de Pesquisa Avan3ada em Terapia de C3ncer, o Instituto e Laborat3rio de Pesquisa onde ocorre a realiza33o dos experimentos; assim como os materiais e equipamentos utilizados nos Protocolos de Cultura Celular e procedimento de S3ntese das Nanopart3culas. Por fim, ser3 apresentada as hip3teses de avalia33o no software linguagem *R* (software de acesso gratuito) assim como o m3todo estat3stico de an3lise; o *teste-t*, como procedimento de aux3lio na interpreta33o dos resultados. Segue abaixo a Figura 6, onde 3 ilustrado o Fluxograma Geral do PPA em TFD.

Figura 6 - Fluxograma Geral do PPA em TFD



Fonte: Autoria Pr3pria (2021)

O ideal em projetos que envolvem TFD é comparar NPs entre si e com o FS em solução. Neste trabalho o FS utilizado foi o MB tanto em solução quanto ligado às NPs. A ligação do MB é comprovada em diferentes espectros de absorvância (com irradiação e sem irradiação). Conforme mostrado na figura 6, após a definição das combinações de NPs e do FS, é realizado os ensaios *in vitro*. Deste modo, é possível analisar a viabilidade celular; por meio dos parâmetros de citotoxicidade e fotoatividade. É realizado o agrupamento de todas os dados coletados para a realização do teste de hipóteses para a verificação da correlação entre os pares. Após esta etapa; obtêm-se por meio de classificação, quais NPs são promissoras; por meio de um novo agrupamento, onde são definidas quais combinações se apresentam mais ou menos citotóxicas e mais ou menos fotoativas. Assim, se torna possível, encontrar as NPs com maior potencial terapêutico no sistema de análise.

3.1 IMPLEMENTAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AVANÇADA (PPA)

3.1.1 Nanopartículas e Aplicações em Terapia de Câncer

Considerando a necessidade de novas alternativas para o tratamento do câncer; em especial o melanoma metastático, e os resultados de estudos que demonstram que NPs bimetálicas, possuem potencial para carreamento de fármacos, tornou-se pertinente o surgimento de PPA para a funcionalização de NPs bimetálicas de ouro e prata com MB. O intuito deste sistema é apresentar a vantagem de intensificar a fotoatividade do MB por acoplamento dos plasmon de superfície das NPs e que promova estabilidade da molécula de MB por protegê-la de interferências do meio externo. Além disso, espera-se que as NPs promovam maior penetração e permanência do MB no tumor já que NPs de 30-100 nm são conhecidas por esse comportamento quando injetas na corrente sanguínea. Assim; justifica-se o objetivo de avaliar a eficiência das NPs metálicas (ouro puro) e bimetálicas (liga de ouro e prata) funcionalizadas com MB para intensificar a fotoatividade do MB. A análise de dados de viabilidade celular de ensaios *in vitro* tem o caráter de verificar o efeito citotóxico das NPs pela funcionalização com MB.

Os dados a serem utilizados neste trabalho foram obtidos em ensaios *in vitro* com células da linhagem B16-F10 Nex2 que constitui um modelo muito útil no estudo do melanoma metastático por possuir histocompatibilidade (compatibilidade ou equivalência entre células, tecidos e órgãos); o que facilita a aproximação dos

resultados *in vitro* dos resultados que poderiam ser observados em tumores. Essas células podem ser facilmente cultivadas *in vitro* e injetadas por diferentes vias *in vivo* para realização de diferentes estratégias experimentais (FERREIRA, 2014). A linhagem B16-F10 Nex2 foi desenvolvida na unidade de Oncologia Experimental (UNONEX - UNIFESP) e é uma sublinhagem das células B16-F10 Nex2 desenvolvidas por Fidler em 1973. No grupo UNONEX foram selecionadas sublinhagens denominadas Nex 1 à 6, com graus distintos de agressividade. A sublinhagem B16F10-Nex2 é a mais próxima da linhagem original, apresentando baixa imunogenicidade e moderada virulência, desenvolvendo tumores subcutâneos que não metastizam para os pulmões, mas formam numerosos nódulos pulmonares quando inoculados por via endovenosa.

3.2 LABORATÓRIO DE PESQUISA

O laboratório de pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unifesp (ICT-UNIFESP) em São José dos Campos – SP; onde foram realizados os ensaios do presente trabalho, possui em suas instalações um espaço físico denominado Sala de Cultura Celular. Neste local, são realizadas pesquisas de desenvolvimento de materiais para carreamento de fármacos e estudo de toxicologia de nanomateriais; nas áreas de bioquímica e biotecnologia, executadas pelo grupo de pesquisa de Nanomateriais e Nanotoxicologia. Existem 4 alunos de Iniciação Científica, 3 alunos de Mestrado e 3 alunos de Doutorado sob orientação da Prof^ª. Dra. Dayane Batista Tada, com auxílio financeiro às suas pesquisas provenientes da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais e Equipamentos

- Pipeta automática e descartável;
- Tubo falcon;
- Garrafas para cultura;
- Tubos criogênico;
- Ponteiras;
- Protetores (luvas, máscara, jaleco);

- Câmara de fluxo laminar (para executar a manipulação);
- Leitor de Placas (Biotek – Sinergy HTX) – Medida de absorvância em 540 nm;
- Cilindro CO₂;
- Estufa com 5% CO₂ e 37°C;
- Banho Maria a 37°C;
- Centrifuga;
- Microscópio Eletrônico;
- Câmara de Neubauer;
- Meio RPMI 1640: mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, ao agir como uma solução nutritiva em cultivo celular. Tem a vantagem de se manter estável por 12 meses se conservado bem fechado e em geladeira, com aspecto róseo e homogêneo;
- Soro bovino: Os meios de cultura celulares são sempre suplementados com soro, seja com soro bovino a 10-20% ou soro fetal bovino a 10-20%;
- DMSO (dimetilsufóxido): Sua ação está relacionada à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, durante um congelamento, é essencial para o preservar as células;
- PBS: O meio de cultura necessita de sistemas tampão para compensar a evolução do CO₂, libertado pelas células e da produção de ácido láctico. Têm como finalidade manter um valor de pH neutro e limpeza celular;
- Tripsina: Para células aderentes, você precisa desprendê-las da placa, na maioria das vezes por tripsinização, que é adicionar tripsina nas células aderentes. Coloca-se na estufa para desprendimento mais rápido das células;
- Álcool 70%: usado para a esterilização do ambiente de trabalho como a superfície das bancadas e do fluxo laminar. O álcool etílico a 70% (v/v) é um excelente desinfetante. Suas propriedades desidratante e desnaturante de proteínas podem ser responsáveis por sua ação antimicrobiana.

3.3.2 Fluxograma Operacional

Os próximos Fluxogramas abaixo, representam as etapas do Protocolo de Cultura Celular, Síntese das NPs e Ensaio de Citotoxicidade e Fotoatividade. O

primeiro passo é o Descongelamento Celular.

Figura 7 - Incubação



Fonte: Autoria Própria (2021)

Após 24 horas de incubação; foi verificado no microscópio eletrônico se houve aderência celular das células na garrafa de cultura (ou preenchimento total do fundo da garrafa se o crescimento celular foi acelerado). Manter por mais 24 horas caso não tenha ocorrido o crescimento das células (células aderidas ao fundo da garrafa em grande número). Se houver células sobrenadantes (meio de cultura com aspecto leitoso) descartar a garrafa de cultura respeitando o procedimento de Desinfecção do Material. Após mais 24 horas ou caso haja aderência total, é iniciado o Protocolo de Cultura Celular, Síntese das NPs e Ensaios de Citotoxicidade e Fotoatividade de acordo com a sequência do Fluxograma Operacional abaixo.

Figura 8 - Fluxograma Operacional



Fonte: Autoria Própria (2021)

3.3.3 Protocolo de Cultura Celular

Objetivo de cultivar células é entender o comportamento da célula fora do seu organismo original, em um meio controlado. A maioria das células vegetais e animais

vivera e proliferará em condições apropriadas de cultivo (*in vitro*). A maioria dos tipos de células, mostra *in vitro* as mesmas propriedades *in vivo*, por exemplo, fibroblastos que continuam a secretar colágeno e células nervosas que estendem axônios fazendo sinapse com outras células.

No presente Trabalho de Conclusão de Curso foram analisadas células de melanoma metastático (B16-F10 Nex-2). O controle das células foi realizado em relação à cinética de crescimento, observando também morfologia e possíveis contaminações. O crescimento celular foi monitorado por meio de contagem com azul de Trypan e análise colorimétrica por ensaio de MTT.

Para o cultivo celular foi utilizado o seguinte meio de cultura: RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%) para células B16-F10 Nex-2, pois a maioria dos tipos de células crescem bem neste meio. Deste modo, foi realizado o ensaio de MTT, que avalia a função mitocondrial da célula, baseando-se na medida da atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2il) – 2,5 difeniltetrazólio) (MTT) que apresenta coloração amarela em cristais de formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) que se acumulam no citoplasma celular. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, ou seja, a enzima em questão é ativa apenas em células com o metabolismo da cadeia respiratória intacto. Desta forma, o formazan é quantificado espectrofotometricamente e possui correlação direta com o número de células viáveis.

Abaixo segue em ordem as atividades do protocolo desenvolvido de cultura celular:

1. Esterilização e limpeza dos materiais. A câmara de fluxo laminar foi limpa internamente com uma solução de álcool 70%. Todos os materiais utilizados dentro do fluxo foram também limpos com álcool 70% antes de serem colocados dentro do fluxo. Finalmente o fluxo foi ligado para ventilação de 10 minutos seguido de irradiação com luz ultravioleta por 10 minutos. As soluções a serem utilizadas (RPMI 1640, PBS, Tripsina, Soro Bovino) foram colocadas no banho-maria a 37°C.

2. Descongelamento celular. Ocorre de forma rápida, retirando-se o tubo de criogênico do nitrogênio líquido e colocando-se em água a 37°C. O processo de criopreservação é danoso para as células e, portanto, após o seu descongelamento as células devem ser colocadas em meio de cultivo. As células B16-F10 Nex-2 apresentam um crescimento acelerado, pois a manutenção do meio de cultura da

célula ocorre após 24 horas.

3.3.3.1 Quantificação Celular

A quantificação é utilizada para definir a viabilidade celular, as condições de crescimento e o início de experimentos nos quais o número de células utilizado deve ser preciso. Na forma de quantificação direta, é utilizado o método de contagem em câmara de Neubauer; onde as células são diluídas com meio de cultura em um tubo falcon. Pipeta-se 90 μL de suspensão de célula mais 10 μL de Azul de Trypan na câmara de Neubauer (pois as células vivas não permitem a passagem do corante).

O número de células por mL de uma suspensão quando contado em câmara de Neubauer é obtido pela equação:

$$(Q1+Q2+Q3+Q4)/4 \cdot 10^4 \cdot \text{fator de diluição (1,1)} = \text{número de células/mL}$$

3.3.3.2 Ensaio do MTT

Para os ensaios de viabilidade celular, foi estabelecido um protocolo de ensaio de MTT:

1. Preparar solução de MTT com água autoclavada na concentração de 2mg/mL.
2. Plaqueamento de células em placas de 96 poços (105 células/cm²).
3. Após 24 horas, retirar o meio velho da placa;
4. Lavar os poços com PBS;
5. Descartar o PBS, e adicionar 100 μL MTT + 900 μL de meio de cultura;
6. Após 3 horas dentro da estufa para reação do MTT, descartar o mesmo;
7. Adicionar 1mL de DMSO lentamente dentro do poço e aguardar 30 minutos para fazer a leitura da absorbância em 540nm.

3.3.3.3 Esterilização do material

Os materiais após o uso, tais como garrafa de cultura celular e ponteiros são lavados com detergente. Após essa lavagem inicial, são deixados em água sanitária pois o hipoclorito de sódio tem propriedades germicidas e, por isso, é amplamente

utilizado no tratamento e purificação da água e esterilização de materiais. Depois desses passos, o material é descartado nos lixos de resíduos biológicos (resíduos infectantes). Já os produtos químicos (como soluções de MTT e formazan) são descartados no lixo químico.

3.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS (NPs)

3.4.1 Síntese das nanopartículas de Ouro (AuNPs)

A síntese das AuNPs foi realizada pelo método de Turkevich (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Uma solução de ácido cloroaurônico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,12 mg/mL em água será colocada em banho-maria a 60 °C por 10 minutos. Uma solução de citrato de sódio 0,4 mg/mL também será aquecida a 60 °C por 10 minutos. As soluções de HAuCl_4 e citrato de sódio são misturadas sob agitação em banho-maria, a uma temperatura de 85 °C, por 3 horas. Após as 3 horas, a solução foi resfriada e armazenada a 4 °C.

3.4.2 Síntese das nanopartículas de Ouro e Prata Core-Shell (AuAgNPs)

Segundo protocolo de Banerjee e colaboradores (2011), foram preparadas soluções aquosas de brometo de cetiltrimetilamônio/CTAB ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ – Sigma Aldrich) 25 mM, ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) 100 mM, nitrato de prata (AgNO_3 – Sigma Aldrich – 99,0%) 10 mM e hidróxido de sódio (NaOH – Synth) 1 M, utilizando em todos os casos água tipo 1 (Milli-Q Direct 8).

Além disso, uma diluição prévia é feita utilizando AuNPs preparadas seguindo o método de Turkevich *et al.* (1951), onde foram utilizados 20 mL de solução de ácido cloroaurico hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ – Sigma Aldrich – 50% a base de Au) $5,0 \cdot 10^{-2}$ M e 10 mL de solução de citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Sigma Aldrich – 99%) 0,3 M. Dessa forma, a solução de AuNPs foi centrifugada a 4500 rpm por 7 minutos, e o sobrenadante diluído 10 vezes.

Em um erlenmeyer, serão adicionados 18,8 mL de água, 200 μL da solução de CTAB e 1 mL da solução de ácido ascórbico. A nova solução será agitada com auxílio de uma barra magnética e chapa de agitação. Depois, ainda sob agitação, foram adicionados 100 μL da solução de AgNO_3 e 2 mL da solução diluída de NPs Au. Por fim, é adicionado gota a gota 0,1 mL da solução de hidróxido de sódio. A solução foi

mantida sob agitação por cerca de 1 hora, e depois armazenada a 4 °C.

3.4.3 Espectroscopia Uv-Visível das nanopartículas (AuNPs e AuAgNPs)

Neste trabalho foi usado o espectrofotômetro FS5-Edimburg Instruments na caracterização das NPs sem MB. Ao identificar as bandas plasmônicas dos metais e após a funcionalização com MB, ao identificar as bandas de absorção molecular do MB. Foi também utilizado o espectrofotômetro do tipo leitor de Placas Biotek – Sinergy HTX para avaliação da viabilidade celular por medidas de absorbância em 540 nm, correspondente à absorção molecular da sonda MTT transformada em formazan por células viáveis.

3.4.4 Preparação dos ensaios de interação das NPs com MB

Para a preparação das AuNPs e AuAgNPs funcionalizadas com MB foi utilizado o procedimento descrito por NARBAND *et al.* (2009). Foram utilizados 3 mL de suspensão das NPs previamente sintetizadas e adicionados à suspensão de NPs 0,5 mL de solução aquosa de MB em concentrações conhecidas. Para a funcionalização das AuNPs, uma solução com concentração de 0,281 nM de partículas, e paralelamente soluções nas concentrações 2,2; 3,17; 6,95 e 10,81 μM de MB foram adicionados separadamente, resultando assim em soluções com concentrações finais de MB de 0,316; 0,453; 0,993 e 1,54 μM (de acordo com os resultados e discussões).

Após 15 minutos de repouso à temperatura ambiente a mistura foi caracterizada por espectroscopia Uv-Vis. Posteriormente foi realizado um novo ensaio utilizando uma suspensão de AuNPs mais concentrada (0,486 nM). E será acrescentada mais duas amostras com misturas de MB com concentrações de 4,00 e 4,50 μM resultando nas concentrações, por poço, de 0,643 e 0,571 μM .

Para as AuAgNPs é utilizado o mesmo protocolo, uma suspensão de AuAgNPs com λ máximo de 0,4 foi preparada, no entanto as concentrações de MB para a funcionalização serão 1,1; 1,41; 1,58; 2,21; 5; 7 e 10,81 μM , resultando em concentrações finais de MB de 0,157; 0,201; 0,225; 0,315; 0,714; 1; 1,54 μM .

3.4.4.1 Avaliação da citotoxicidade das AuNPs

Para avaliar a possível interferência das NPs Au na leitura de absorvância do MTT foi realizado um ensaio em triplicata. Primeiro, em uma placa de 96 poços é usado 100 μL por poço de uma solução de AuNPs em diferentes concentrações (2,59; 2,22 e 1,3 nM) dissolvidas 100 μL de água tipo 1.

Em seguida, foram usadas as mesmas quantidades e concentrações de NPs Au misturadas com 100 μL de uma solução de MTT. A placa é incubada por 3 horas e em seguida foi feita a leitura da absorvância em 540 nm. Posteriormente, a solução é removida de todos os poços para acrescentar 100 μL de DMSO. Deste modo, é feita novamente a leitura das placas.

3.4.4.2 Avaliação da fotoatividade das AuNPs funcionalizadas com MB

As células B16-F10-Nex2 com 80% de confluência nas garrafas foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 4.103 células/poço e permaneceram em incubadora a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas. O experimento é realizado em quintuplicata para cada amostra. As mostras utilizadas foram: controle de células, com apenas as células em meio de cultura; controle de NPs, onde as amostras terão apenas NPs; controle de MB, que consiste em solução aquosa de MB e suspensão de AuNPs com MB em diferentes concentrações. Para o controle de NPs é preparado uma suspensão com 3 mL de AuNPs e 0,5 mL de água tipo1 e depois foram adicionados 20 μL dessa suspensão em cada poço com 280 μL de meio, resultando em uma concentração de 0,241 nM de NPs por poço.

Para as amostras com diferentes concentrações de MB na suspensão com AuNPs é preparada uma suspensão estoque em uma concentração de MB de 1,54 μM . Foram utilizadas alíquotas de 5, 10 e 20 μL dessa solução em cada poço e depois adicionado meio de cultura suficiente para completar o volume de 300 μL por poço. Portanto, cada grupo amostral de AuNPs com MB terá uma concentração de MB diferente, sendo elas: 0,18; 0,62; 1,23; 4,4 μM . As células foram então incubadas por 12 horas, lavadas e uma das placas será irradiada com uma dose de 102 J/cm². Após adicionar meio de cultura, as células foram incubadas novamente por mais 12 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e o MTT é cuidadosamente adicionado e após 3 horas de incubação e retirada do MTT, o DMSO foi adicionado e a leitura de absorvância realizada a 540 nm. Para uma maior uniformidade dos resultados apenas os três valores intermediários serão considerados. Os resultados

de viabilidade serão calculados considerando a média da absorbância dos poços onde será acrescentado apenas meio e que não foram irradiados como a viabilidade celular de 100 %.

Em outro ensaio de viabilidade celular é mantida a concentração constante de MB em 2,20 μM e será utilizado concentrações variadas de AuNPs. Assim, foram usadas as amostras: controle de células, controle de AuNPs [0,82 nM], controle de AuNPs sem células, e suspensões de AuNPs nas concentrações de 0,82; 0,41 e 0,07 nM com MB na concentração de 2,20 μM . A incubação das células com as amostras será realizada por 12 horas, seguida de lavagem com PBS e incubação por mais 12 horas. No ensaio do MTT foi realizado a viabilidade celular de células incubadas apenas com meio de cultura, sendo considerada como 100% de viabilidade.

3.4.4.3 Procedimento de avaliação dos resultados do efeito da concentração de AuNPs na fotoatividade do MB

Após as etapas 3.4.4.1 e 3.4.4.2, foi realizado o teste de citotoxicidade e fotoatividade; ao testar nas células B16F10-Nex2 (incubadas com diferentes concentrações de AuNPs, as suspensões foram preparadas em meio de cultura e as concentrações informadas são referentes à AuNPs no poço):

- Controle Negativo (células sem material ou fotossensibilizador);
- AuNPs na concentração de 0,816 nM (sem MB);
- MB 2,2 μM (sozinho);
- MB com 2,2 μM interagindo com AuNPs em diferentes concentrações (0,816; 0,408 e 0,074 nM).

3.4.4.4 Procedimento de avaliação do efeito do aumento da concentração de MB adsorvido nas AuNPs

Novamente, foi realizado o teste de citotoxicidade e fotoatividade deste experimento; onde há novas combinações interagindo nas células B16F10-Nex2 (incubadas com AuNPs 0,24 nM) e MB em diferentes concentrações, conforme estruturado abaixo:

- Controle Negativo (células sem material ou fotossensibilizador);

- AuNPs na concentração de 0,24 nM;
- MB 8,80 μ M (sozinho);
- AuNPs 0,24 nM com MB em diferentes concentrações (1,23 μ M; 0,616 μ M e 0,176 μ M).

3.4.4.5 Avaliação da citotoxicidade das AuAgNPs

Para avaliar a citotoxicidade das AuAgNPs, as células serão plaqueadas na concentração de 104 células/mL e incubadas por 12 horas. O meio de cultura foi substituído por diferentes volumes da suspensão de AuAgNPs (10; 20; 30; 40; 50 μ L). O volume total em cada poço é mantido como 250 μ L.

Após 24 horas de incubação com as NPs, foi realizado o ensaio de MTT e absorbância será medida em 540 nm. Os valores de absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura foram utilizados para calcular o valor médio considerado como 100% de viabilidade.

3.4.4.6 Avaliação da fotoatividade das AuAgNPs funcionalizadas com MB

As células serão cultivadas e plaqueadas da mesma forma que no ensaio de MTT com as NPs Au. Neste ensaio serão utilizadas as seguintes amostras: controle de células, controle de AuAgNPs, controle de MB [8,80 μ M] e amostras com 0,93 μ g/mL e 0,23 μ g/mL de AuAgNPs com MB [2,20 μ M]. No controle de células serão adicionados apenas 250 μ L de meio de cultura. As células serão então incubadas por 12 horas, lavadas e uma das placas irradiada com uma dose de 102 J/cm². Após adicionar meio de cultura, as células serão incubadas por mais 12 horas. Em seguida, as células serão novamente lavadas com PBS e o MTT será cuidadosamente adicionado.

Será feita uma outra incubação de 3 horas e depois o MTT será retirado, o DMSO será adicionado e a leitura de absorbância será realizada a 540 nm. Para uma maior uniformidade dos resultados apenas os três valores intermediários serão considerados. Os resultados de viabilidade serão calculados considerando a média da absorbância dos poços onde será acrescentado apenas meio e que não serão irradiados como a viabilidade celular de 100%.

3.4.4.7 Procedimento de avaliação dos resultados da citotoxicidade das AuAgNPs

Após a realização dos itens 3.4.4.5 e 3.4.4.6, executou-se a análise de viabilidade celular (%). Ao estruturar o teste de citotoxicidade da AuAgNPs interagindo com as células B16F10-Nex2, é criado o sistema abaixo sem irradiação:

- Controle Negativo (células sem material ou fotossensibilizador);
- Controle Positivo (DMSO - dimetilsulfóxido);
- AuAgNPs nas concentrações: 0,57 mg/mL; 1,63 mg/mL; 2,86 mg/mL e 8,16 mg/mL.

3.4.4.8 Procedimento de avaliação da fotoatividade de AuAgNPs funcionalizadas com MB

É realizado um novo experimento com NPs bimetálicas, para analisar outras combinações e suas respectivas viabilidades celular das amostras com e sem irradiação. É montado um sistema de análise da citotoxicidade e fotoatividade deste experimento; onde há novas combinações da AuAgNPs com fotossensibilizador MB interagindo nas células B16F10-Nex2, conforme estruturado abaixo:

- Controle Negativo (células sem material ou fotossensibilizador);
- Controle Positivo (DMSO - dimetilsulfóxido);
- MB 2,2 μ M (sozinho);
- AuAgNPs 0,23 μ g/mL;
- AuAgNPs 0,23 μ g/mL com MB 2,2 μ M;
- AuAgNPs 0,93 μ g/mL com MB 2,2 μ M.

3.5 PROPOSTA DE ANÁLISE NA LINGUAGEM R

Atualmente o Grupo de Pesquisa de Nanomaterias e Nanotoxicologia do ICT-UNIFESP utiliza o Excel na organização e interpretação dos dados gerados em seus experimentos. O Excel é um programa que permite fazer análises estatísticas; não necessitando essencialmente de um pacote estatístico. Também possui a opção "Análise de Dados" no menu "Ferramentas" que inclui estatística descritiva, histogramas, teste-t, ANOVA e regressão linear. A vantagem que está instalado no

pacote Office da Microsoft na maioria dos computadores pessoais; porém não tem muita flexibilidade e a execução dos comandos não é tão simples.

Já o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) é um dos programas mais utilizados na pesquisa médica. Uma das vantagens desse software em relação a seus concorrentes comerciais são: o licenciamento perpétuo, ou seja, não há cobrança de aluguéis anuais, e a fácil manipulação por meio de menus, o que facilita o entendimento das ferramentas e técnicas disponíveis. Sendo o custo elevado (a principal desvantagem), é recomendado utilizar versões simplificadas disponibilizadas para estudantes a um custo mais acessível; se tornando uma excelente alternativa para o grupo em suas pesquisas atuais e futuras (PAES, 2008).

O presente trabalho; no desenvolvimento facultativo do tema, tem a intenção de mostrar a iniciantes as premissas para se modelar problemas de sistemas biológicos. Os sistemas de software apresentados até o presente momento neste trabalho (Excel, Software IBM SPSS) são baseados em diferentes linguagens de computador (ou seja, semântica e sintaxe) e boas alternativas para a condução na análise de dados. Entretanto, para a condução da análise dos experimentos; em específico para encontrar o *valor-p*, foi utilizada a linguagem de programação R, pois é muito utilizada na literatura (LIN *et al.*, 2017).

Lin *et al.* (2017) utilizou modelos em softwares; dentre eles a linguagem R, para análises em nanopartículas de ouro (que é objeto de estudo no presente trabalho). Este software ajuda pesquisadores com dados a serem interpretados independentemente das habilidades em programação e possui licença livre. Os modelos com nanopartículas foram traduzidos com sucesso por meio de soluções bem correlacionadas entre si. Ao entender que um Engenheiro de Produção; em sua atuação como gestor de projetos voltados a biotecnologia, tem como horizonte direcionar sua equipe; de farmacologistas, toxicologistas e avaliadores de risco à saúde, a desenvolver aprendizado em programas específicos, delimitando os atributos e parâmetros de uma linguagem nova para um problema complexo. Portanto, a linguagem R apresenta-se como uma plataforma de programação de alto nível; poderosa, devido ao fato de ser usada em várias áreas; especialmente em análises estatísticas.

O presente trabalho tem a intenção de explorar esta alternativa; por meio do software linguagem R, ao interpretar o *valor-p* de acordo com a literatura; ao direcionar a aceitação ou rejeição das Hipóteses Nula (H_0) ou Alternativa (H_1). Assim, com base

nos resultados gráficos obtidos no Excel; de caracterização do material e viabilidade celular, quais combinações apresentam-se como solução de melhor combinação entre as Nanopartículas Fotossensibilizadoras.

3.6 TESTE - *t*

Segundo Dancey e Reidy (2019) o *teste-t* é usado quando há duas condições para avaliar-se existe uma diferença significativa entre as médias.

O *teste-t independente* é usado quando os participantes são alocados para apenas uma de duas condições, isto é, um delineamento independente, entre participantes ou não relacionado. Um *teste-t pareado, relacionado* ou *emparelhado* é utilizado quando os participantes estão em ambas as condições, isto é, um delineamento relacionado, intraparticipantes ou de medidas repetidas (DANCEY e REIDY, 2019).

Segundo Fávero e Belfiore (2017) implementa-se o teste *emparelhado* para analisar se as médias de duas amostras emparelhadas ou relacionadas, extraídas da mesma população (antes e depois) com distribuição normal, são ou não diferentes significativamente. O teste exige a normalidade dos dados (o que justifica a correlação de Pearson “*p*”) e a homogeneidade de variâncias entre os grupos.

3.7 PROCEDIMENTO DE INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

3.7.1 *Teste-t pareado* no presente problema

No presente Trabalho de Conclusão de Curso, será utilizado o *teste-t pareado*, analisando duas condições: células B16-F10-Nex2 de melanoma com nanopartículas metálicas e bimetálicas expostas a duas condições; sem irradiação e com irradiação de luz, para buscar as seguintes respostas abaixo:

- a. Qual proporção resulta em nanopartículas menos tóxicas para as células?
- b. Qual proporção resulta em nanopartículas mais tóxicas para as células após ter sido ligada à molécula de fotossensibilizador (fármaco)?

O *teste-t pareado* foi escolhido como metodologia de análise, pois existe uma diferença na média da Fotoestabilidade Celular (sem irradiação de luz e com irradiação de luz) em um dos ensaios de um aluno do Projeto de Mestrado em desenvolvimento no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNIFESP de

São José dos Campos – SP.

3.7.2 Primeira Hipótese

Será apresentado um teste de hipótese inicial para verificar a capacidade das Nanopartículas agregarem-se com o MB. A força dessa agregação será avaliada por meio do valor de absorvância registrado pelo Espectros de absorção UV-Vis do ensaio de interação entre NPs (Au e AuAg) com azul de metileno (MB). Ao inserir na *linguagem R* os dados do ensaio de interação; com o pressuposto paramétrico, foi elaborado duas hipóteses:

H_0 = Irradiação de luz não afeta a funcionalização das NPs com MB

H_1 = irradiação de luz afeta a funcionalização das NPs com MB

3.7.3 Segunda Hipótese

No segundo passo; será realizado a análise de viabilidade celular em relação a Citotoxicidade, ao inserir na *linguagem R* os dados do experimento das Nanopartículas (Au e AuAg) com azul de metileno (MB) interagindo com células de melanoma metastático (B16-F10 Nex-2). Ao respeitar o pressuposto paramétrico, foi elaborado duas hipóteses:

H_0 = Irradiação de luz não afeta a Citotoxicidade das NPs

H_1 = Irradiação de luz afeta a Citotoxicidade das NPs

3.7.4 Terceira Hipótese

No terceiro passo; será realizado a análise de viabilidade celular em relação a Citotoxicidade na primeira interação bimetálica, onde os valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10-Nex2 são obtidos por meio da incubação de AuAg NPs na ausência de irradiação. Entendendo que o ideal em projetos é comparar as NPs entre si, foi inserido na *linguagem R* os dados do experimento das AuAgNPs interagindo com células de melanoma metastático (B16-F10-Nex2). Ao respeitar o pressuposto paramétrico, foi elaborado duas hipóteses:

H_0 = Ausência de irradiação não afeta a Citotoxicidade das AuAgNPs

H_1 = Ausência de irradiação afeta a Citotoxicidade das AuAgNPs

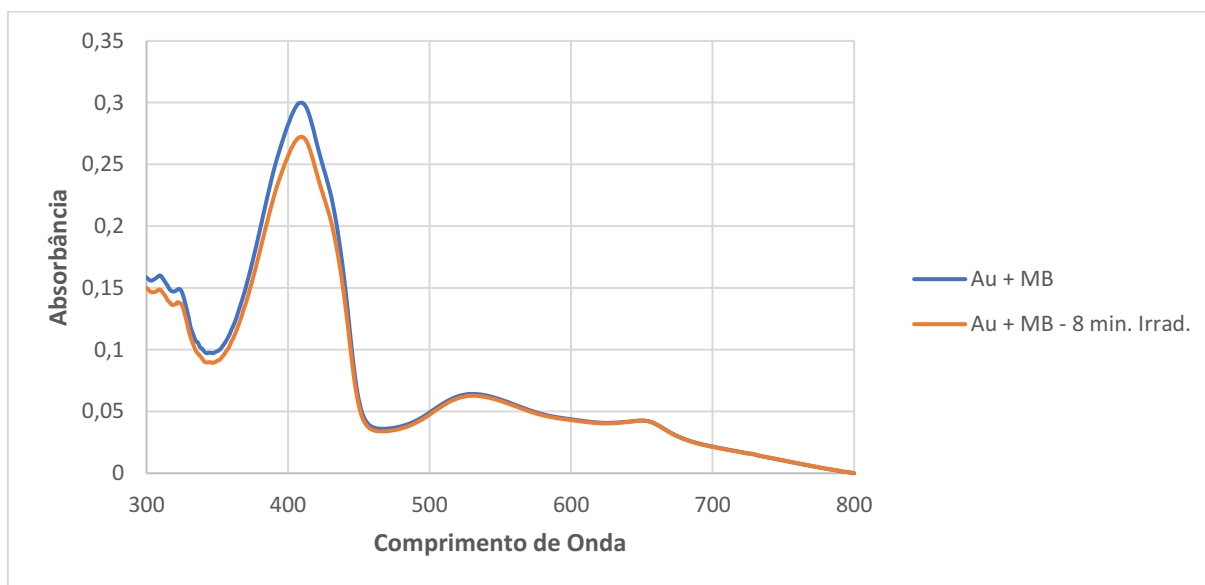
4 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

4.1 INTERAÇÕES ENTRE NPs SINTETIZADAS E FOTOSSENSIBILIZADOR MB

Após a síntese e caracterização das NPs, foi realizada a funcionalização das NPs Au e AuAg, com o MB. Essa funcionalização consiste na adsorção do MB na superfície das NPs.

A associação de FS às NPs metálicas tem sido divulgada como uma ferramenta para modulação da fotoatividade dessas moléculas. A avaliação das melhores condições que permitem a maior incorporação de MB nas AuNPs e AuAgNPs foi realizada por espectroscopia de absorção no UV-Vis. A figura 9 mostra os espectros de absorção UV-Vis de AuNPs após funcionalização com MB, tendo as curvas no instante inicial de absorção ($t= 0$ minutos) e após um certo período momento ($t= 8$ minutos).

Figura 9 – Espectros de absorção UV-Vis das AuNPs após funcionalização com MB



Fonte: Autoria Própria (2021)

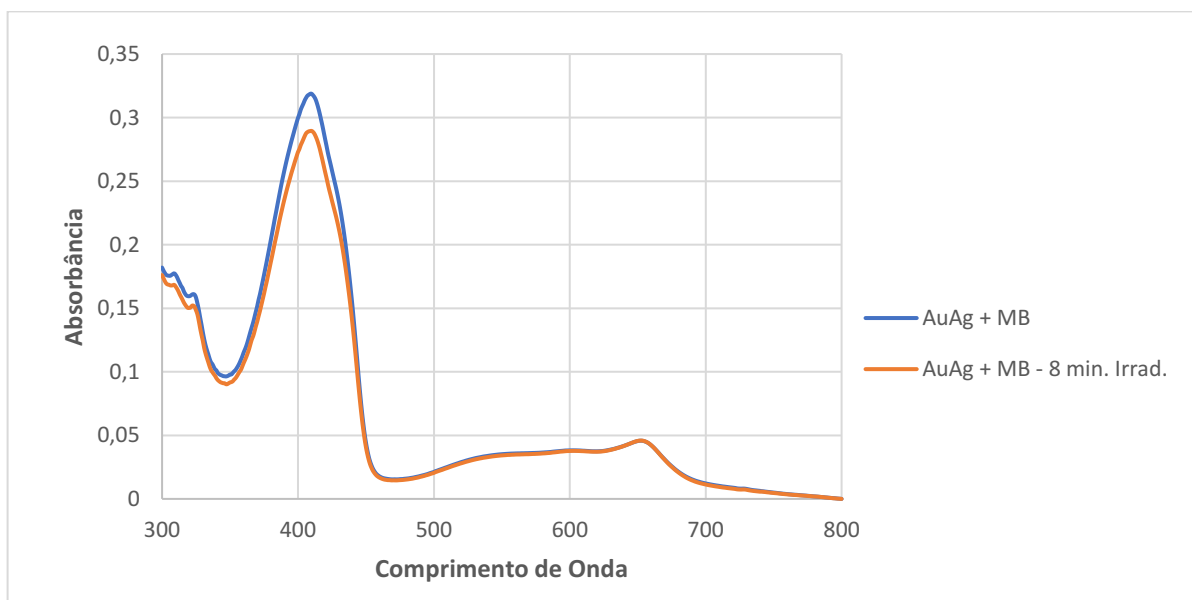
Na análise de caracterização das NPs, o foco é interpretar a interação das combinações com o fotossensibilizador (MB). Uma vez que a absorbância é proporcional à concentração, podemos avaliar quantitativamente a adsorção do MB nas NPs. O espectro de absorção UV-Vis das AuNPs (Figura 9) apresentou máximo de absorção em 410 nm. Como apresentado no item 2.1, esse máximo corresponde à condição de ressonância plasmônica, sendo característico da natureza da

nanopartícula metálica, bem como de sua dimensão, geometria e estado de agregação.

Além das bandas de absorção devido ao plasmon de superfície das NPs e da absorção molecular do MB, as NPs em suspensão geram também espalhamento de luz e uma vez que a luz incidente é espalhada, portanto, uma intensidade menor é detectada, o espectrofotômetro gera um resultado de alta absorbância em todo o espectro. Assim, a absorbância fica acima de zero ainda que nenhuma molécula ou plasmon absorva luz na região de 800 nm. Para corrigir o efeito de espalhamento de luz e normalizar os espectros das NPs; foi utilizada para interpretação algébrica, o valor medido na primeira leitura de comprimento de onda sem irradiação das NPs (Au e Au@Ag) com MB, como fator de subtração (por meio de um tabelamento de registro dos dados no software Excel).

A figura 10 mostra os espectros de absorção UV-Vis de AuAgNPs após funcionalização com MB, tendo as curvas no instante inicial de absorção ($t=0$ minutos) e após um certo período ($t=8$ minutos).

Figura 10 – Espectros de absorção UV-Vis das AuAgNPs após funcionalização com MB



Fonte: Autoria Própria (2021)

No espectro de absorção das AuAg o máximo de absorção foi detectado também em 410 nm, o que de acordo com a literatura corresponde à banda plasmônica dessas NPs. A presença das bandas de absorção máxima tanto da banda plasmônica dos metais quanto da absorção do MB nos espectros comprovou a

adsorção do MB nos dois tipos de NPs.

Desta forma, foi possível comparar os valores de absorvância na região de 410 nm para avaliar em qual das NPs a adsorção de MB foi maior. As absorvâncias encontradas nas AuNPs ($A=0.299895$ em $t=0$ e $A=0,27228$ em $t=8$ minutos) em comparação com as absorvâncias encontradas nas AuAgNPs ($A=0.318759$ em $t=0$ e $A=0,289537$). Portanto, a adsorção de MB nas AuAgNPs foi maior do que nas AuNPs.

4.2 LINGUAGEM R E *valor-p* APLICADO

Realiza-se o Teste de Hipóteses em linguagem R para verificar a correlação dos dados sem irradiação e com irradiação das NPs (Au e Au@Ag). A premissa para aceitar a Hipótese Nula (H_0) é o *Valor-p* ser maior que 0,05; e para rejeitar H_0 ser menor que 0,05. Segue abaixo o *Scripting*.

Figura 11 – Script linguagem R

```

1 #DADOS
2 dados_sem_irradiacao<-c()
3
4 dados_com_irradiacao<-c()
5
6 ### Verificando a normalidade dos dados
7 ## verificar graficamente
8 # histogramas
9 hist(dados_sem_irradiacao)
10 hist(dados_com_irradiacao)
11 # qqplot
12 qqnorm(dados_sem_irradiacao)
13 qqline(dados_sem_irradiacao)
14 qqnorm(dados_com_irradiacao)
15 qqline(dados_com_irradiacao)
16 ## determinar o Skewness e Kurtosis
17 # incluir a biblioteca agricolae
18 library(agricolae)
19
20 skewness(dados_sem_irradiacao)
21 skewness(dados_com_irradiacao)
22
23 kurtosis(dados_sem_irradiacao)
24 kurtosis(dados_com_irradiacao)
25
26 ## Teste de Shapiro-Wilk
27 shapiro.test(dados_sem_irradiacao)
28 shapiro.test(dados_com_irradiacao)
29
30 #Teste de Wilcoxon signed rank
31 wilcox.test(dados_sem_irradiacao, dados_com_irradiacao, paired=TRUE)
32
33 ## Os testes de Wilcoxon mostraram a presença de ties, por isso ? necessario a aplica??o do teste wilcox.exact()
34 library(exactRankTests) #inclus??o da biblioteca
35
36 wilcox.exact(dados_sem_irradiacao, dados_com_irradiacao, paired=TRUE, alternative="two.sided", exact=FALSE)
37
38 ## gr?ficos boxplot
39 boxplot(dados_sem_irradiacao, dados_com_irradiacao, names=c("Dados sem irradiacao", "dados com irradiacao"))
40

```

Fonte: Autoria Própria (2021)

Os resultados encontrados seguem abaixo no Quadro 2 abaixo:

Quadro 2 – *Valor-p*

	Au + MB	AuAg + MB
<i>valor-p</i>	2,2 x e-16	2,2 x e-16

Fonte: Autoria Própria (2021)

Ao rejeitar H_0 ; aceita-se H_1 , na primeira hipótese (irradiação de luz afeta a interação das NPs com MB) quanto a caracterização das NPs com MB.

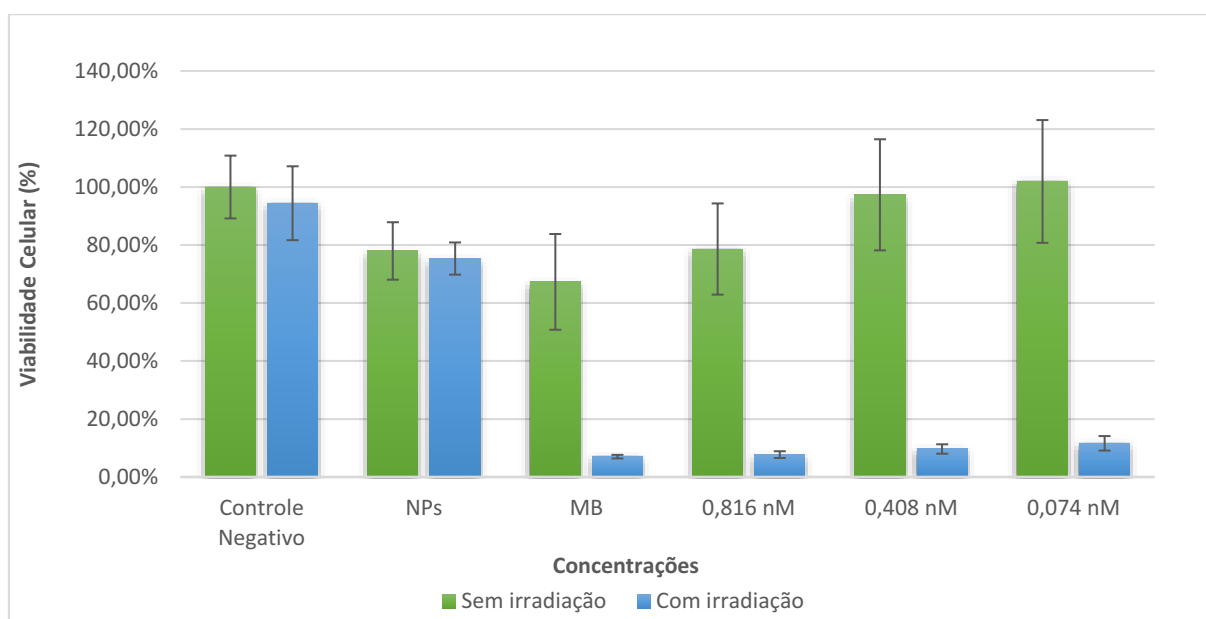
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOATIVIDADE DE NPs Au FUNCIONALIZADAS COM MB

4.3.1 Avaliação do efeito da concentração de AuNPs na fotoatividade do MB

Com o intuito de avaliar a influência das AuNPs na fotoatividade do MB, foi realizado o primeiro ensaio *in vitro*, variando-se a concentração de AuNPs e mantendo-se constante a concentração de MB. Em uma análise do sistema TFD é preciso avaliar a citotoxicidade; na ausência e presença de irradiação. Um sistema pode ser considerado promissor se apresentar baixa citotoxicidade na ausência de irradiação e alta citotoxicidade sob irradiação uma vez que dessa forma, poderia ser fotoativado apenas no local de tratamento. Assim, neste ensaio, a citotoxicidade do MB na presença e ausência de irradiação será comparada com a sua citotoxicidade na presença e ausência de irradiação após sua adsorção nas AuNPs.

Na figura 11 é possível ver os valores médios e desvios padrão de viabilidade para as células incubadas com MB em solução e adsorvido ($[MB] = 2,20 \mu M$) nas AuNPs em diferentes concentrações (0,816; 0,404 e 0,074 nM).

Figura 12 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10 Nex2 incubadas com AuNPs, MB em solução e MB adsorvido ($2,2 \mu M$) em AuNPs em diferentes concentrações na presença e ausência de irradiação



Fonte: Autoria Própria (2021)

Com base no teste de hipóteses (do item 3.7.3) ao aplicar as amostras separadamente na linguagem R; aceita-se H_0 ($p > 0,05$), onde a irradiação de luz não afeta a citotoxicidade das AuNPs. Neste ensaio; a maior concentração usada de AuNPs (0,816 nM) tanto na mistura com MB quanto no controle de AuNPs; foi equivalente à concentração usada por Narband et al. (2009) os quais também divulgaram ausência de citotoxicidade de AuNPs. Neste trabalho, de forma semelhante ao trabalho mencionado, a viabilidade celular das células incubadas apenas com as AuNPs foi alta (acima de 75%), demonstrando que nesta concentração a citotoxicidade das AuNPs é baixa.

Ao comparar a viabilidade celular após incubação com MB em solução na concentração de 2,2 μM com a viabilidade celular após a incubação com MB na mesma concentração, mas adsorvido nas AuNPs, sob irradiação, foi possível observar que não houve diferença significativa e a viabilidade em todos os casos foi próxima a 7%. Assim, conclui-se que a presença das AuNPs não induziu aumento de fotoatividade do MB independente da concentração de AuNPs.

Mesmo que os resultados tenham indicado que não há aumento da fotoatividade do MB ao adsorvê-lo nas AuNPs, é preciso ressaltar que esse efeito tóxico do MB em baixas concentrações observadas *in vitro* dificilmente será observado em um ensaio *in vivo*, já que essa baixa concentração de MB poderia comprometer a eficiência da terapia uma vez que parte das moléculas são desativadas por biomoléculas. Por outro lado, a aplicação do MB adsorvido nas AuNPs ainda que a baixas concentrações pode garantir um efeito *in vivo* similar ao observado *in vitro* já que as AuNPs podem proteger o MB de desativação e ainda aprimorar sua seletividade pelo tecido tumoral.

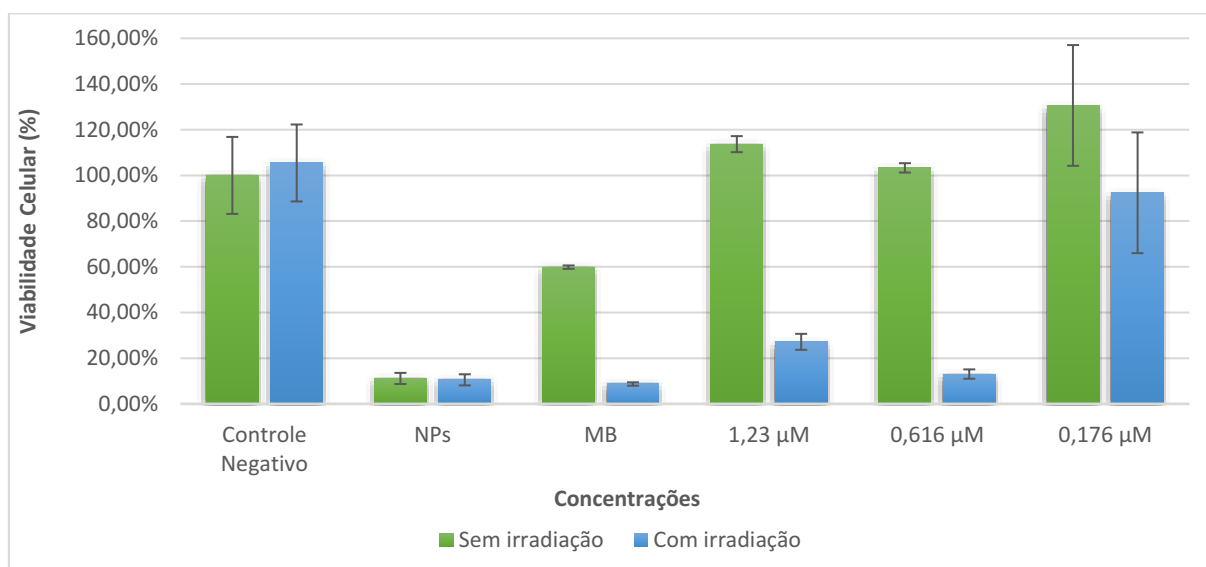
Portanto, as AuNPs com MB apresentaram-se eficientes nos *ensaios in vitro* uma vez que mantiveram a alta fotoatividade mesmo em concentrações muito baixas como 0,074 μM ; ao garantir o controle e segurança do sistema (DOS SANTOS et al., 2017). Nota-se uma queda da viabilidade celular de 90,32% depois das células serem submetidas a irradiação, o que consiste em um alto valor o suficiente para o material ser considerado citotóxico. Segundo o descrito na ISO 10993-5 (2009), para um material ser considerado citotóxico a partir de ensaios *in vitro* deve induzir uma redução da viabilidade celular maior de 30%, quando se compara o grupo ao controle (100%).

Outro resultado de destaque observado neste ensaio foi que as células incubadas com as amostras de AuNPs contendo MB apresentaram alta viabilidade na ausência de irradiação e os valores encontrados (77-102%) foram maiores que os valores encontrados para MB em solução (68%) nas mesmas condições. Esse resultado demonstrou que a ligação de MB nas AuNPs diminuiu a toxicidade do MB na ausência de irradiação, o que é importante para termos um sistema com baixo efeito colateral.

4.3.2 Avaliação do efeito do aumento da concentração de MB adsorvido nas AuNPs

Nesta etapa, o objetivo foi avaliar se o aumento da concentração de MB nas AuNPs poderia induzir aumento de fotoatividade. Mantendo-se a concentração de AuNPs constante e aumentando-se a concentração de MB esperava-se encontrar uma razão de AuNPs: MB em que a maior fotoatividade fosse alcançada.

Figura 13 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10 Nex2 incubadas com MB em solução e adsorvido em diferentes concentrações nas AuNPs



Fonte: Autoria Própria (2021)

O teste de hipóteses na linguagem R (do item 3.7.3) aceita-se H_0 ($p > 0,05$), onde a irradiação de luz não afeta a citotoxicidade das AuNPs. Nos poços incubados com MB em solução, foi possível observar uma diferença significativa de viabilidade entre os poços irradiados e não irradiados, o que demonstrou a baixa citotoxicidade do MB na ausência de irradiação e a alta fotoatividade do mesmo (o que reforça a

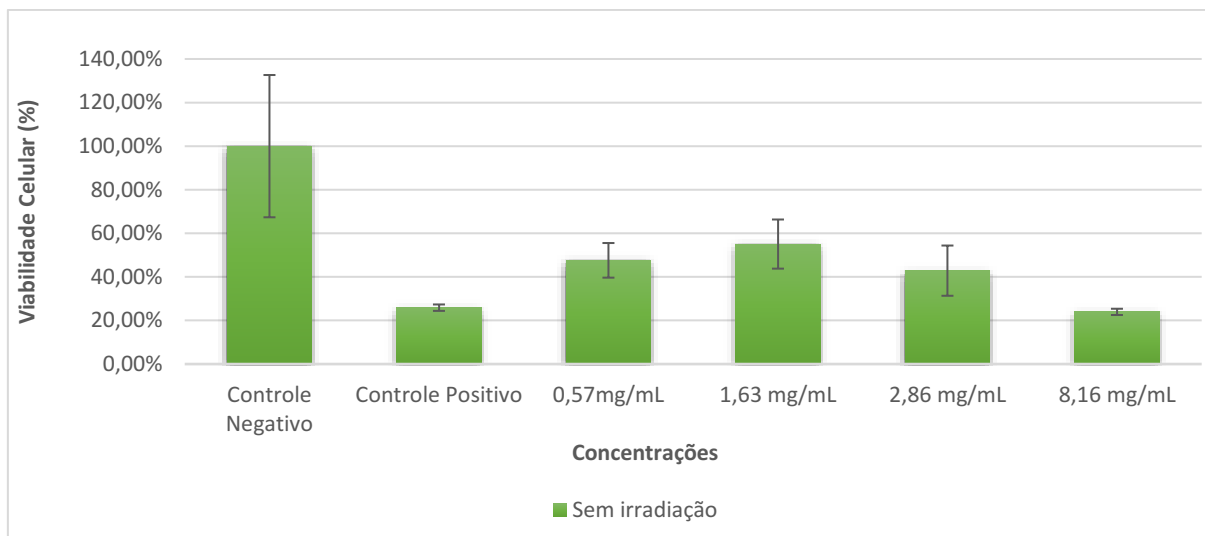
hipótese nula, H_0). Nos grupos em que as células foram incubadas com MB em diferentes concentrações adsorvido nas AuNPs (diferente do modelo proposto no NPs Au estavam conjugadas concentrações de MB (diferente do modelo proposto no 4.3.1); não se observou citotoxicidade na ausência de irradiação, já que em todos os grupos, as células apresentaram viabilidades acima de 100%, garantindo o controle e segurança do sistema de acordo com Dos Santos et al. (2017). Quando MB adsorvido nas AuNPs foi estudado – nas concentrações de 0,176 μM e 0,78 μM de MB; notou-se pequeno decréscimo da viabilidade celular (38,23%) comparando-se células submetidas a irradiação com células incubadas com as mesmas amostras na ausência de irradiação, indicando baixa fotoatividade do sistema de MB adsorvido nas AuNPs nessas concentrações. Segundo o descrito ISO 10993-5 (2009), para um material ser considerado citotóxico a partir de ensaios *in vitro* ele deve ter uma redução de viabilidade celular maior de 30%, quando se compara o grupo ao controle (100%).

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOATIVIDADE DE NPs AuAg FUNCIONALIZADAS COM MB

4.4.1 Avaliação da citotoxicidade das AuAgNPs

Para que um tipo de NP seja considerado promissor para aplicação biomédica, é preciso que na ausência de fármaco ele não apresente citotoxicidade. Nesta etapa do trabalho, as AuAgNPs foram investigadas para possível aplicação em TFD. Assim, primeiramente foi realizado um estudo para investigar o efeito citotóxico das AuAgNPs sem MB. A figura 13 mostra os valores médios e desvios padrão de viabilidade de células incubadas com as AuAgNPs em diferentes concentrações.

Figura 14 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade celular de células B16-F10 Nex 2 incubadas com AuAg NPs na ausência de irradiação



Fonte: Autoria Própria (2021)

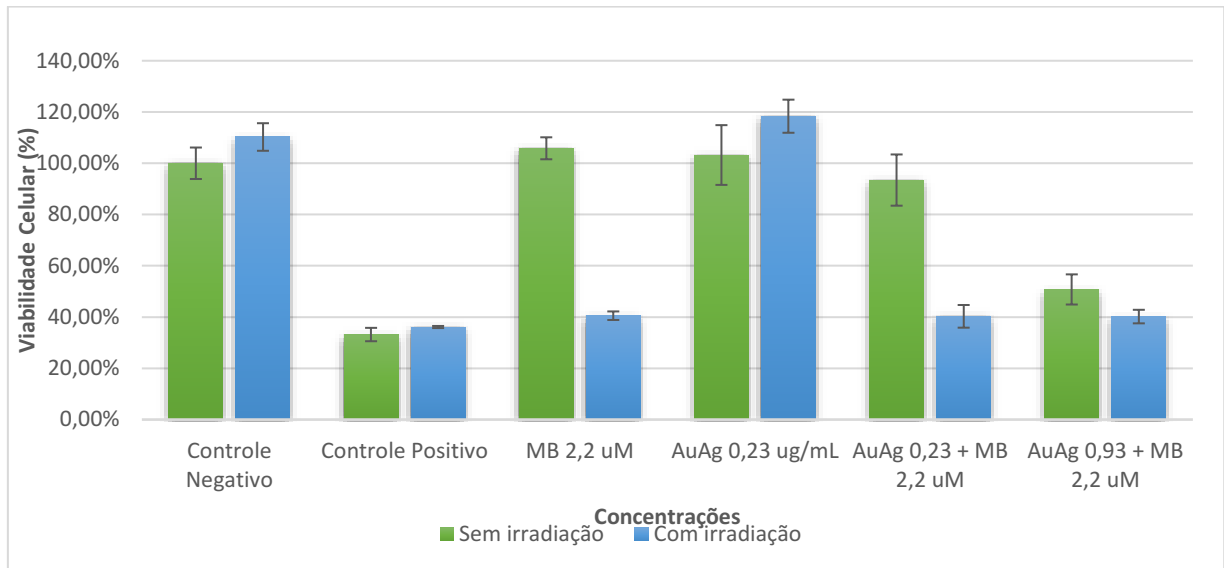
Por meio do teste de hipóteses (do item 3.7.4); ao aplicar as amostras separadamente na linguagem R, rejeita-se H_0 e aceita-se H_1 , sendo que a ausência de irradiação afetou as AuAgNPs; onde o o Controle Positivo (DMSO) e as alternativas de concentrações 0,57 mg/mL; 1,63 mg/mL, 2,86 mg/mL e 8,16 mg/mL, apresentaram-se tóxicas para as células usadas. As células incubadas com AuAg apresentaram valores de viabilidade abaixo de 60%. Ao compararmos as amostras entre si, a combinação menos citotóxica foi de 1,63 mg/mL e a mais citotóxica foi 8,16 mg/mL. Conclui-se que a citotoxicidade não foi dosedependente da concentração; devido os valores de viabilidade celular terem sido diferentes entre si.

4.4.2 Avaliação da fotoatividade de AuAgNPs funcionalizadas com MB

Nesta etapa, o objetivo foi investigar se a adsorção de MB nas AuAgNPs poderia resultar em uma maior fotoativação. Como no ensaio apresentado acima indicou alta citotoxicidade das AuAgNPs, nesta etapa essas NPs foram utilizadas em concentração sete mil vezes menor (1,63 mg/mL para 0,23 μ g/mL). A figura 14, apresenta os valores médios e desvios padrão de viabilidade de células incubadas com AuAg funcionalizadas com MB. Duas análises puderam ser realizadas com os dados apresentados. Comparando-se os valores de viabilidade de células incubadas com AuAgNPs funcionalizadas com MB com os valores de viabilidade de células

incubadas apenas com MB em solução, foi possível avaliar o efeito das NPs sobre a fotoatividade do MB.

Figura 15 – Valores médios e desvios padrão de viabilidade de células incubadas com AuAg funcionalizadas com MB (2,2 μ M)



Fonte: Autoria Própria (2021)

No teste de hipóteses aplicado (do item 3.7.3) nas amostras com MB; ao inserir os dados no *Script* da linguagem R, rejeitou-se H_0 ($p < 0,05$) em todas as alternativas de AuAgNPs bimetálicas; exceto na AuAg 0,93 μ g/mL com MB 2,2 μ M (onde se aceita H_0 , em que a irradiação de luz não afeta a citotoxicidade das NPs). A concentração de 0,23 μ g/mL apresentou-se como uma concentração de segurança das AuAgNPs, já que a viabilidade das células incubadas com essas NPs na concentração mencionada na presença e ausência de irradiação manteve-se acima de 100%. Ao considerar novamente a ISO 10993-5 (2009), a AuAg 0,23 μ g/mL com MB 2,2 μ M e a AuAg 0,93 μ g/mL com MB 2,2 μ M; podem ser consideradas como material citotóxico, pois a redução da viabilidade celular apresenta-se maior que 30% (40,29 % e 40,19% respectivamente).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho de conclusão de curso foi possível colocar em prática as habilidades em análises de dados e multidisciplinaridade, ao desenvolver a problemática do presente tema e resolver por meio da linguagem de programação R (usada para análise de dados estatísticos) para embasamento na avaliação da citotoxicidade das NPs e capacidade de cada tipo de NP em intensificar a fotoatividade do MB quando adsorvido nas NPs. Ao aplicar-se o teste de hipótese (por meio da formulação de uma hipótese nula e alternativa) e validar por meio do *script*, foi possível interpretar a diferença entre os valores médios dos resultados de viabilidade celular em que as células de melanoma metastático B16-F10 Nex 2 foram tratadas com MB em solução ou adsorvido nas AuNPs. Deste modo, verificou-se que a adsorção de MB nas AuAgNPs foi maior do que nas AuNPs; sendo validado por meio do teste de hipóteses (item 4.2) em que a irradiação de luz afeta a interação das NPs com MB. Nos ensaios em que a viabilidade celular de células B16-F10 Nex 2 tratadas com MB em solução foram comparadas com a viabilidade celular de células incubadas com MB adsorvido em AuAgNPs, foi possível observar que não houve aumento de fotoatividade enquanto a citotoxicidade na ausência de irradiação aumentou.

Uma vez que uma plataforma promissora para aplicação em TFD de câncer deve apresentar baixa toxicidade na ausência de irradiação e alta toxicidade na presença de irradiação, os estudos aqui apresentados indicaram que a plataforma constituída de AuNPs funcionalizadas com MB apresentaram maior potencial terapêutico do que as AuAgNPs funcionalizadas com MB.

Vale ressaltar, que o cenário atual em que a sociedade enfrenta (o Brasil, atualmente, apresenta uma das maiores taxas de infecção pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2, e de número absoluto de mortos em todo o mundo), frente aos diversos questionamentos quanto às estratégias políticas para enfrentamento da doença, fez com que o trabalho fosse desenvolvido de modo colaborativo entre duas instituições públicas (UTFPR e UNIFESP) de modo remoto.

REFERÊNCIAS

ABEPRO (Associação Brasileira de Engenharia de Produção). **Associação Brasileira de Engenharia de Produção, 2008.** Disponível em: <<http://www.abepro.org.br/interna.asp?c=362>>. Acesso em: 22 out. 2020.

ANDERSON, D. R.; SWEENEY, D. J.; WILLIAMS, T. A.; CAMM, J. D.; COCHRAN, J. J.; **Estatística aplicada a administração e economia.** 8ª Edição. São Paulo: Cengage Learning, 2019.

BANERJEE, M.; SHARMA, S.; GHOSH, S. S. Enhanced antibacterial activity of bimetallic gold-silver core-shell nanoparticles at low silver concentration. **Nanoscale**, v.3, p.5120-5125, 2011. doi: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1039/C1NR10703H>

BATISTA, A. J. S.; PEPE, V. L. E.; The challenges of nanotechnology for the sanitary vigilance of medication. **Ciência & saúde coletiva** 19(7), pp. 2105-2114, 2014. doi: <https://doi.org/10.1590/1413-81232014197.02462013>

CANASSA, T. A.; LAMONATO, A. L.; RIBEIRO, A. V. Utilização da lei de Lambert-Beer para determinação da concentração de soluções. **JETI: Journal of Experimental and Techniques Instrumentation**, v.1, n.2, 2018. doi: <https://doi.org/10.30609/jeti.v1i2.5930>

CHENG, Y. *et al.*; Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. **Nature Communications** 6,8785 (2015). doi: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1038/ncomms9785>

CHO, J. H. *et al.*; Development of a novel imaging agent using peptide-coated gold nanoparticles toward brain glioma stem cell marker CD133. **Acta Biomaterialia**, v. 47, p. 182–192, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.009>

COSTA, C. S.; Epidemiologia do câncer de pele no Brasil e evidências sobre sua prevenção. **Diagnostico Tratamento**, v. 17, n. 4, p. 206-8, 2012. URI:

<http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3341.pdf>

CSAPÓ, E. et al.; Synthesis and characterization of Ag/Au alloy and core (Ag)-shell (Au) nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** **415**, pp. **281-287**, **2012**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.005>

DANCEY, C. P.; REIDY, J.; **Estatística sem Matemática para psicologia**. 7ª Edição. Porto Alegre: Artmed. 2019.

DAVIS, M. E.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. **7**, n. **9**, p. **771–782**, **2008**. doi: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1038/nrd2614>

DOS SANTOS, A. et al.; Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. **17**, p. **194**, **2017**. doi: [10.1186/s12885-017-3179-7](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7)

FÁVERO, L. P.; BELFIORE, P.; **Manual de análise de dados: estatística e modelagem multivariada com Excel, SPSS e Stata**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

FERREIRA, M.; **Nanoestruturas – Princípios e Aplicações**. Rio de Janeiro: GEN LTC, 2014.

FERREIRA, M. B.; Avaliação do papel da proteína TCTP em melanoma murinho. **Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2014**. URI: <http://hdl.handle.net/1884/49141>

FIELD, A.; **Descobrendo a estatística usando o SPSS**. 5ª Edição. Porto Alegre: Penso, 2020.

GIURIATTI, T. et al.; **Análise do P&D Brasileiro com Uso da Nanotecnologia em**

Medicamentos para Consumo Humano: pesquisas, tecnologias e produtos. Cadernos de Prospecção ISSN:1983-1358 (impresso) / ISSN: 2317-0026 (on-line). doi:<http://dx.doi.org/10.9771/cp.v13i1.31806>. Disponível em: <<https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/31806>>. Acesso em: 01 abr. 2021.

GOMES, A. P. A.; Nanotecnologia aplicada ao tratamento da acne. **Biblioteca – Dissertações de Metrado integrado em Ciências Farmacêuticas (Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias – Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde), 2013.** URI: <http://hdl.handle.net/10437/4364>

GOTTARDO, S. *et al.*; NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials. **Science for Policy report by the Joint Research Centre (JRC), the European Commission’s science and knowledge service.** April 2017. doi:10.2760/245972

HAMMOND, P. T.; Shooting for the moon: nanoscale approaches to cancer. **ACS Nano 10(2), pp. 1711-1713, 2016.** doi: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acsnano.6b01095>

INCA (Instituto Nacional de Câncer). **Ministério da Saúde do Brasil, 2020.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em: 22 out. 2020.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. **Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Third edition (2009).**

KHAN, S.; ALAM, F.; AZAM, A.; KHAN, A. U.; Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: A novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm. **International Journal of Nanomedicine 7, pp. 3245-3257, 2012.** doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S31219>

LIN, Z. *et al.*; Performance Assessment and Translation of Physiologically Based Pharmacokinetic Models From acsIX to Berkeley Madonna, MATLAB, and R Language: Oxytetracycline and Gold Nanoparticles As Case Examples. **Toxicological**

Sciences, Volume 158, Issue 1, July 2017, Pages 23–35. Published: 08 April 2017.

doi: 10.1093/toxsci/kfx070

MATSUSHITA, A. F. Y.; **Preparação e caracterização de nanopartículas de Ag e ZnO e incorporação em fibras de tecidos de algodão.** 2014. 146 f. Dissertação (Mestrado em Química) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2014. URI: <http://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/2128>

MONTEIRO, A.; VIADANA, A. G.; Análise de poluição da água: a técnica do azul de metileno. Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos (SBRH). **Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, Campo Grande, Brasil, página 11, 2009.** URI: https://abrh.s3.sa-east-1.amazonaws.com/Sumarios/110/b34749f1683ca4a4a1a8abef0a09912d_146dec0d1f528af05d7fc0f37336aa20.pdf

MONTEIRO, B. R.; Indicadores de monitorização e desempenho nas unidades de saúde familiar e os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável na saúde (ODS 3): uma análise comparada em Portugal no período de 2013-2018. **Ciênc. saúde coletiva vol.25 no.4 Rio de Janeiro. 2020.** doi: <https://doi.org/10.1590/1413-81232020254.31422019>

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros.** 6ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

NANoREG. **Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovações, 2021.** Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html>. Acesso em: 24 abr. 2021.

NARBAND, N. *et al.*; The interaction between gold nanoparticles and cationic and anionin dyes: enhanced UV-visible absorption. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 0, p. 10513-10518, 2009. doi: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1039/B909714G>

NAVES, L. B. *et al.*; Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. **Prog**

Biomater. 2017 May; 6(1-2):13-26. doi: 10.1007/s40204-017-0064-z

PAES, Â. T.; Por dentro da estatística. **Einstein: Educ. Contin. Saúde**, v. 6, p. 107-108, 2008. Disponível em: < http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1771-EC_V8_N3_pg109-10.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2020.

POPIM, R. C.; CORRENTE, J. E.; MARINO, J. A. G.; SOUZA, C. A.; Skin cancer: use of preventive measures and demographic profile of a risk group in the city of Botucatu. **Ciênc. saúde coletiva** v.13 n.4 Rio de Janeiro, 2008. doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000400030>

RAMALHO, K. M. *et al.*; In vitro evaluation of methylene blue removal from root canal after Photodynamic Therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, n. July, p. 248–252, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.10.024>

ROZENFELD, H.; **Gestão de desenvolvimento de Produtos: uma referência para a melhoria do processo.** São Paulo: Saraiva, 2006.

SAFWAT, M. A. *et al.*; Gold nanoparticles enhance 5-fluorouracil anticancer efficacy against colorectal cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 648–658, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.076>

SANTOS, M. E. V.; Novas Terapias para o câncer de pele do tipo melanoma. **Trabalho de conclusão de curso apresentado ao IBMR – Laureate International Universities - Bacharel em Biomedicina.** 2017. URI: <https://www.ibmr.br/files/tcc/novas-terapias-para-o-cancer-de-pele-do-tipo-melanoma-marcella-esteves-vita-santos.pdf>

SBD. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, 2020. Disponível em: < <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-dapele/64/#sintomas> >. Acesso em: 8 nov. 2020.

SCHULZ, P. A.; Nanomateriais e a interface entre nanotecnologia e ambiente. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health**

Surveillance under Debate: Society, Science & Technology) – v. 1, n. 4, p. 53-58, 2013. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/67>. Acesso em: 11 abr. 2021. doi: 10.3395/vd.v1i4.67pt

SKOOG, D. A.; WESR, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

SPUDEIT, D. A.; Determinação de parâmetros de qualidade do biodiesel utilizando espectrofotometria UV/Vis. **Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, (QMC 5512) - (2009)**. URI: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/99781>

SUN, J.; KORMAKOV, S.; LIU, Y.; HUANG, Y.; WU, D.; YANG, Z.; Recent Progress in Metal-based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy. **Molecules** **23(7),1704, 2018**. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23071704>

TADA, D. B.; BAPTISTA, M. S.; Photosensitizing nanoparticles and the modulation of ROS generation. **Frontiers in Chemistry** **3 (MAY), 33, 2015**. doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00033>

TARDIVO, J. P. *et al.*; Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, **v. 2, n. 3, p. 175–91, 2005**. doi: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J.; A study of the nucleation and growth Processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussion on the Faraday Society**, v.11, p. 55-75, 1951.

TOMA, H. E.; **Nanotecnologia Experimental**. São Paulo: Blucher, 2016.

TOMA, H. E.; **Nanotecnologia Molecular: materiais e dispositivos**. São Paulo: Blucher, 2016.

YAMADA, M.; FOOTE, M.; PROW, T. W.; Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology** 7(3), pp. 428-445, 2015. doi: <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1002/wnan.1322>