



Universidade Federal de Alagoas
Escola de Enfermagem e Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
PPGCF



**PREPARAÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS DE OURO E
SEUS EFEITOS NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

Ábner Magalhães Nunes

Maceió – Alagoas
Março de 2017

Ábner Magalhães Nunes

**PREPARAÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS DE OURO E
SEUS EFEITOS NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite

Maceió – Alagoas

Março de 2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária

Bibliotecário Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

N872p Nunes, Ábner Magalhães.
Preparação de nanoestruturas híbridas de ouro e seus efeitos na bioenergética mitocondrial / Ábner Magalhães Nunes. - 2018.
134 f. : il.

Orientador: Mario Roberto Meneghetti.

Coorientadora: Ana Catarina Rezende Leite.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 119-131.

Anexos: f. 132-134.

1. Nanobastões de ouro – Síntese. 2. Albumina sérica bovina. 3. Mitocôndria.
4. Bioenergética. I. Título.

CDU: 615: 547.962.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ata do Exame de Defesa de Dissertação do Mestrando
Ábner Magalhães Nunes

Aos **três dias** do mês de **março** de **2017**, às nove horas e trinta minutos, reuniu-se na Sala 1 do CIC (Centro de Interesse Comunitário/UFAL, a banca examinadora composta pelos docentes doutores e pelas docentes doutoras, Mario Roberto Meneghetti; Ana Catarina Rezende Leite; Camila Braga Dornelas; Luciano Aparecido Meireles Grillo; Josué Carinhonha Caldas Santos, para o **Exame de Defesa da dissertação** intitulada: "**Preparação de Nanoestruturas Híbridas de Ouro e seus Efeitos na Bioenergética Mitocondrial**", elaborada pelo Mestrando **Ábner Magalhães Nunes**, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Mestrado, Matrícula Institucional 15130065, sob a orientação do Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti; que presidiu os trabalhos, e coorientação da Profa Ana Catarina Rezende Leite. Após apresentação por 40 minutos, o mestrando foi arguido pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 12:15 horas, os examinadores emitiram o seguinte parecer: _____

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 12:16 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pelo Mestrando Maceió, 03 de março de 2017.

Presidente (Orientador): Prof. Dr.: _____

Coorientadora: Profa. Dra _____

Examinadora Interna: Profa. Dra.: _____

Examinador Interno: Prof. Dr.: _____

Mestrando: _____

Examinador externo: Josué Carinhonha

Aos meus pais Paulo e Núbia que dignamente me apresentaram a importância da família e ao caminho da verdade, honestidade e persistência

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer presente a cada momento da minha jornada, mostrando o caminho nas horas incertas e amparo nos momentos difíceis. A Ele, a glória e meu especial agradecimento.

Aos meus pais (Sr. Paulo Nunes e Sra. Núbia Nunes), pelo incessável amor e empenho nos ensinamentos espirituais e materiais. A vocês dedico esta dissertação, por sempre primarem pela nossa educação e crescimento pessoal, por fazerem o possível e o impossível pela realização dos nossos sonhos.

Aos meus irmãos, Amanda Nunes e Jônathas Nunes, pela cumplicidade, apoio e por serem meus grandes exemplos. A toda minha família, pelo suporte, em especial aos meus sobrinhos Pedro Henrique e Ana Clara e ao meu cunhado Eduardo.

Ao Prof. Dr. Mario Meneghetti, pela confiança, oportunidade de trabalhar ao seu lado durante esses anos e por ser o maior incentivador na superação dos meus limites e à Prof.^a Dr.^a Ana Catarina, pela dedicação nas correções e coorientações.

À Prof.^a Dr.^a Monique Angelo da Silva, pelas contribuições no desenvolver do trabalho e verdadeira amizade contruída em Cristo.

A minha equipe de trabalho (Kleyton Monteiro e Claudia Calado) seus esforços e organização tornaram meu desafio de lidar com o tempo possível.

Aos professores das bancas examinadoras da qualificação e dissertação.

Aos meus companheiros da fé, pelas orações e apoio durante este momento.

A todos os membros do Laboratório de Catálise e Reatividade Química (GcaR), atuais e egressos, que contribuíram para minha formação pessoal e como pesquisador e aos companheiros do LaMP.

À Prof.^a Dr.^a Éurica Ribeiro e ao Prof. Dr. Daniel Gitaí por disponibilizarem o seu biotério e o seu laboratório durante a etapa de experimentação.

Aos técnicos Daniel Ricarte, Aldir e Elvan Filho por todo suporte.

Aos Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e em Química e Biotecnologia, por todo apoio e disponibilidade de sua estrutura para realização deste trabalho. Aos professores de ambos programas pelas muitas contribuições.

À Universidade Federal de Alagoas e às instituições de colaboração Instituto Ageu Magalhães, Centro de Tecnologia do Nordeste e Universidade de Campinas.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece”.

Benjamin Disraeli.

LISTA DE ABREVIações

Abs	absorbância
ADP	difosfato de adenosina
ADP/O	razão entre a concentração de ADP e oxigênio
ATP	trifosfato de adenosina
AuNRs	nanobastões de ouro
AuNPs	nanopartículas de ouro
BSA	albumina sérica bovina
CCCP	carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
Cdk	quinase dependente de ciclina
CR	controle respiratório
CTABr	brometo de cetiltrimetilamônio
Cys	cisteína
DLS	dispersão dinâmica da luz
EGTA	ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetra acético
EROS	espécies reativas de oxigênio
FC	fosfatidilcolina
GSH	glutathiona
GPx	glutathiona peroxidase
H₂DCF	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MET	microscopia eletrônica de transmissão
NIR	região próxima ao infravermelho
N_s	número de átomos da superfície
N_v	número de átomos totais
OLIGO	oligomicina
PBS	tampão fosfato salino
PDAMAC	cloreto de poli(dialildimetilamônio)
PEG-SH	polietilenoglicol
P_i	fosfato inorgânico
PTPM	poro de transição de permeabilidade mitocondrial
PSS	ácido poli(4-estireno sulfônico)

Q	ubiquinona
RPS	ressonância de plásmon de superfície
SI	substrato para o complexo I
TOABr	brometo de tetraoctilamônio
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
TPx	tio-redoxina peroxidase
TSH	tio-redoxina
UV-Vis	ultravioleta e visível
λ_{max1}	comprimento de onda máximo
MFR	mitocôndrias isoladas de fígado de ratos
MITO	mitocôndrias
$\Delta\Psi$	potencial elétrico mitocondrial

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Proporção de átomos na superfície de uma partícula esférica com número total de átomos (N_v) e átomos na superfície (N_s)	22
FIGURA 2 - Principais abordagens na preparação de nanomateriais	23
FIGURA 3 - Etapas de nucleação e crescimento na formação de nanopartículas de acordo com a concentração do soluto.....	24
FIGURA 4 - Métodos de estabilização de nanopartículas	25
FIGURA 5 - Taça de Licurgo	26
FIGURA 6 - Número total de publicações com os termos <i>nanotechnology</i> e <i>gold</i> associado a <i>nanotechnology</i> no portal de periódicos CAPES/MEC.....	27
FIGURA 7 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas esféricas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich.....	28
FIGURA 8 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de (A) e (B) nanopartículas esféricas sintetizadas pelo método de Brust e (C) esquema de síntese	28
FIGURA 9 - Dinâmica de formação de nanobastões de ouro pelo método mediado por semente.....	29
FIGURA 10 - Interação da luz com uma nanopartícula esférica promovendo a oscilação coletiva dos elétrons.....	30
FIGURA 11 - Bandas correspondentes a ressonância de plásmon de superfície de nanopartículas de ouro (A) esféricas e (B) bastões.....	31
FIGURA 12 - Espectros de UV-Vis (A) de nanobastões com diferentes taxas de proporção e (B) suas respectivas micrografias de MET	32
FIGURA 13 - Transmitância de nanobastões de ouro (A) frente a diferentes potências de laser e (B) respectivas imagens de MET.....	33
FIGURA 14 - Terapia fototérmica com o uso de AuNRs em (A) células normais e (B) e (C) tumorais. O círculo representa a área de ação do laser	35
FIGURA 15 - Ilustração dos diferentes métodos de bioconjugação de nanobastões de ouro.....	37
FIGURA 16 - Esquema da equação química responsável entre a interação Au-S.....	37
FIGURA 17 - (A) Deslocamento na região do infravermelho próximo dos nanobastões de ouro incubados com BSA e (B) esquema de interação.....	38
FIGURA 18 - Papel das proteínas quinases dependentes de ciclina e ciclinas na regulação do ciclo celular	43
FIGURA 19 - Viabilidade de três linhagens celulares frente a AuNRs: uma cancerosa (A) A549 e duas normais (B) 16HBE e (C) MSC	50
FIGURA 20 - Localização intracelular de AuNRs em imagens de MET da linhagem A549 (tumoral): M = mitocôndria, L = lisossomo e E = endossomo.....	50
FIGURA 21 - Mitocôndria e sua estrutura: (A) desenho esquemático e (B) micrografia de MET	58

FIGURA 22 - O fluxo de elétrons e os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons	61
FIGURA 23 - Teoria quimiosmótica aplicada a mitocôndria. Fluxo de elétrons acompanhado do bombeamento de prótons e estabelecimento do potencial eletroquímico acoplado a síntese de ATP	63
FIGURA 24 - Estados da respiração	64
FIGURA 25 - Esquema do mecanismo de abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial dependente de Ca^{2+} e P_i	68
FIGURA 26 - Esquema de centrifugação e incubação dos AuNRs	76
FIGURA 27 - Esquema ilustrando a formação dos polímeros de safranina	81
FIGURA 28 - Esquema ilustrando a relação do inchamento mitocondrial com a luz. O aumento do volume mitocondrial torna o índice de refração da dispersão ($n_3 < n_2$) menor, levando a diminuição da absorbância da luz.....	82
FIGURA 29 - (A) Espectro de UV-Vis dos nanobastões de ouro sintetizados e (B) sua respectiva micrografia de MET	86
FIGURA 30 - Espectros de UV-Vis de nanobastões de ouro. (A) comparação antes e após a lavagem e (B) comparação com os AuNRs tratados com BSA ..	88
FIGURA 31 - Imagens de MET de nanobastões de ouro (A) antes e (B) após o tratamento com BSA. Sistema coloidal (C) antes e (D) após o tratamento com BSA	90
FIGURA 32 - Nanobastões de ouro revestidos com BSA (AuNRs) diminuem a respiração mitocondrial	94
FIGURA 33 - Potencial de membrana mitocondrial no estado de repouso e ativo de fosforilação	98
FIGURA 34 - AuNRs aceleram a dissipação do potencial de membrana mitocondrial induzido por Ca^{2+}	100
FIGURA 35 - Efeito da solução tampão fosfato com BSA (PBS/BSA) no potencial de membrana mitocondrial	102
FIGURA 36 - Produção de H_2O_2 por mitocôndrias de fígado na presença ou não de AuNRs	104
FIGURA 37 - Nanobastões de ouro induzem diminuição na produção de H_2O_2 na ausência de Ca^{2+}	105
FIGURA 38 - Medida da geração de espécies reativas de oxigênio via oxidação de H_2DCFDA por mitocôndrias isoladas na presença de AuNRs em diferentes concentrações	107
FIGURA 39 - Interação de nanobastões de ouro com o H_2O_2	108
FIGURA 40 - Redução do inchamento mitocondrial induzido por nanobastões de ouro em presença de Ca^{2+}	110
FIGURA 41 - Efeito da CsA sobre a ação dos AuNRs no potencial elétrico de membrana mitocondrial	112
FIGURA 42 - Efeito da CsA sobre a ação do AuNRs na indução do inchamento mitocondrial	112

FIGURA 43 - Influência de AuNRs na morfologia de mitocôndrias isoladas por imagens de microscopia de transmissão.....**113**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Medicamentos a base de nanomateriais aprovados por um ou mais órgãos	47
TABELA 2 - Reagentes e solventes.....	73
TABELA 3 - Características dos nanobastões obtidos	87
TABELA 4 - Diâmetro hidrodinâmico dos nanobastões de ouro	90
TABELA 5 - Diâmetro médio de mitocôndrias isoladas em presença ou não de AuNRs calculado através das imagens de microscopia eletrônica de transmissão	115

RESUMO

PREPARAÇÃO DE NANOESTRUTURAS HÍBRIDAS DE OURO E SEUS EFEITOS NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Nanobastões de ouro (AuNRs) são nanomateriais promissores em aplicações biomédicas principalmente devido a suas propriedades ópticas singulares e as suas principais abordagens de funcionalização ou modificação de sua superfície. Recentemente, alguns grupos avaliaram a ação anticancerígena seletiva de AuNRs causando morte de células tumorais através de danos mitocondriais. Neste presente estudo, AuNRs recobertos com albumina sérica bovina (BSA) foram sintetizados e avaliados quanto ao seu efeito na bioenergética mitocondrial. AuNRs foram sintetizados pelo método mediado por semente na presença de brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) e incubados com BSA em pH 7,4. Os AuNRs obtidos com esse tratamento foram caracterizados por espectroscopia de UV-Vis, dispersão dinâmica da luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os espectros de absorção de UV-Vis apresentaram bandas típicas de AuNRs. Após o tratamento com BSA, o plásmom de superfície longitudinal, característico de AuNRs, teve um deslocamento batocrômico de ca. 20 nm, evidenciando o ancoramento da BSA na superfície dos AuNRs. As caracterizações por DLS e as micrografias de MET não demonstraram variações significativas no tamanho ou forma dos AuNRs após a adição de BSA (ca. 11 x 42 nm). Os efeitos *in vitro* dos AuNRs em mitocôndrias isoladas de fígado de rato em diferentes concentrações (6,25 – 100 μM) foram avaliados através da análise dos parâmetros de respiração mitocondrial (complexo I), potencial de membrana ($\Delta\psi$), inchamento mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e MET. Os resultados indicaram que os AuNRs foram capazes de reduzir o controle respiratório das mitocôndrias por meio da diminuição do estado de fosforilação (V_3) e do estado desacoplado (V_{CCCP}). Os AuNRs provocaram redução na produção de EROS, na presença ou ausência de cálcio, além de um retardo no inchamento mitocondrial. No entanto, a presença de AuNRs resultou na perda do potencial de membrana mesmo na presença de ciclosporina A (CsA) e, na maior concentração (100 μM), desorganização das cristas mitocondriais e descolamento intermembranar. Esses resultados indicam que AuNRs modificados com BSA possivelmente interagem com os complexos da cadeia respiratória, interrompendo o fluxo de elétrons e causando danos mitocondriais, independente da presença de Ca^{2+} . Este estudo fornece novas evidências sobre os mecanismos de ação de AuNRs na bioenergética mitocondrial e, conseqüentemente, na morte celular.

Palavras-chave: Nanobastões de ouro, Albumina sérica bovina, Mitocôndria, Bioenergética, Câncer

ABSTRACT

PREPARATION OF GOLD HYBRID NANOSTRUCTURES AND THEIR EFFECTS ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC

Gold nanorods (AuNRs) are promising nanomaterials for applications in biomedicine due to their singular optical properties and potential of surface modifications. Recently, studies have evaluated the use of AuNRs for selective death of cancer cells by mitochondrial damage. In this present study, AuNRs capped with bovine serum protein (BSA) were synthesized and their effect on the mitochondrial bioenergetics were evaluated. AuNRs were synthesized by the seed mediated method in the presence of cetyltrimethylammonium bromide (CTABr), and incubated with BSA at pH 7.4. The AuNRs thus obtained were characterized by UV-vis spectroscopy, Dynamic light scattering (DLS) and Transmission electron microscopy (TEM). The UV-vis absorption spectra showed the presence of typical AuNRs. After the treatment with BSA the longitudinal surface plasmon resonance was changed in ca. 20 nm red shift near-infrared. That was an evidence of presence of BSA on to AuNRs surface. The DLS characterization and TEM images showed no significant changes in AuNRs dimensions (ca. 11 x 42 nm) after the addition of BSA. We verified AuNRs effects *in vitro* at isolated rat liver mitochondria in a dose-dependent manner (6.25 - 100 μ M) at mitochondrial respiratory rates parameters (complex I), membrane potential ($\Delta\psi$), mitochondrial swelling, reactive oxygen species (ROS) production, and TEM. In these results, AuNRs decreased respiratory control ratio by decreasing phosphorylation state (V_3) and uncoupled state (V_{CCCP}). AuNRs also provoked the decreasing in ROS production in the presence or absence of Ca^{2+} in addition to a delay on mitochondrial swelling. However, AuNRs caused the mitochondrial potential dissipation even in the presence of cyclosporin A (CsA), and at the highest concentration of gold (100 μ M), AuNRs induced a disorder on mitochondrial crests and the intermembrane separation. These results indicate that BSA-adsorbed AuNRs may possibly interact with electron chain complex and interrupt the electron flow causing mitochondrial damages independent on the presence of Ca^{2+} . This study provides new evidences of BSA-adsorbed AuNRs effects on mitochondrial bioenergetics.

Key words: Gold nanorods, Bovine serum albumin, Mitochondria, Bioenergetic, Cancer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO	18
1.1.1	Objetivos específicos	18
2	SÍNTESE, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE NANOBASTÕES DE OURO	20
2.1	NANOMATERIAIS	20
2.2	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO	22
2.3	ESTABILIZAÇÃO	25
2.4	OURO	26
2.5	PRINCIPAIS MÉTODOS DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	27
2.6	NANOBASTÕES DE OURO	29
2.7	PROPRIEDADES ÓPTICAS	30
2.8	APLICAÇÕES	32
2.9	BIOCONJUGAÇÃO	36
3	CÂNCER E NANOESTRUTURAS	41
3.1	ONCOGÊNESE	41
3.2	CICLO CELULAR	42
3.3	TRATAMENTO	44
3.4	CÂNCER E NANOESTRUTURAS	46
4	METABOLISMO E BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	54
4.1	METABOLISMO HEPÁTICO	54
4.2	METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	55
4.3	METABOLISMO DE LIPÍDEOS	56
4.4	METABOLISMO DE PROTEÍNAS	57
4.5	MITOCÔNDRIAS	58
4.6	RESPIRAÇÃO CELULAR	59
4.7	ESTADOS DO CONTROLE RESPIRATÓRIO	63
4.8	INIBIDORES E DESACOPLADORES MITOCONDRIAIS	64
4.9	GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	65
4.10	TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL	66
4.11	MITOCÔNDRIA E MORTE CELULAR	69

4.12 MITOCÔNDRIA E CÂNCER	70
5 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	73
5.2 MATERIAIS, SOLVENTES E REAGENTES	73
5.3 SÍNTESE DE NANOBASTÕES DE OURO	74
5.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE.....	76
5.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	76
5.6 INFLUÊNCIA DE NANOBASTÕES EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO.....	77
5.6.1 Animais	77
5.6.2 Isolamento de mitocôndrias hepáticas	78
5.6.3 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	78
5.6.4 Ensaio com mitocôndrias	79
5.6.5 Exposição aos nanobastões de ouro	79
5.6.6 Consumo de oxigênio mitocondrial	79
5.6.7 Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial.....	80
5.6.8 Medida de inchamento mitocondrial.....	81
5.6.9 Estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)	82
5.6.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Mitocôndrias	83
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
6.1 SÍNTESE DE NANOBASTÕES DE OURO	86
6.2 TRATAMENTO COM PROTEÍNA SÉRICA BOVINA (BSA).....	87
6.3 MODELO EXPERIMENTAL.....	90
6.4 RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL	91
6.5 POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	97
6.6 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	103
6.6.1 EROS (Amplex-RED).....	103
6.6.2 EROS (H_2DCFDA).....	106
6.7 INCHAMENTO MITOCONDRIAL.....	119
6.8 ESTUDOS COM UM INIBIDOR DA TPM.....	111
6.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISÃO.....	113
7 CONCLUSÕES	117

REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS.....	138

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes por ano. Muitos avanços têm sido realizados acerca da terapia antitumoral, contudo a maioria dos agentes utilizados no tratamento do câncer afetam tanto células neoplásicas como normais, acarretando em drásticos efeitos adversos. Dessa forma, muito se tem investido no desenvolvimento de novas drogas mais eficazes e menos tóxicas (TORRE et. al. 2012; INCA, 2016). Neste contexto os nanomateriais tem obtido grande destaque.

Nanomateriais podem ser definidos como materiais que apresentam uma de suas dimensões em escala nanométrica atingindo um tamanho crítico, no qual novas propriedades se manifestam (ZARBIN, 2007). O domínio da técnica de produção de nanomateriais possibilitou a sua aplicação em diversas áreas da ciência, tais como óptica, eletrônica, catálise, biologia e com uma relevante ação na área biomédica. Devido a suas propriedades particulares, nanopartículas de ouro têm sido amplamente estudadas na terapêutica de diversas patologias, inclusive do câncer.

Os nanobastões de ouro são considerados materiais promissores na terapia antitumoral, principalmente devido a suas propriedades físico-químicas diferenciadas. Essas partículas apresentam uma absorção característica na região do visível e no infravermelho próximo do espectro eletromagnético, sendo esta última capaz de conferir a elas uma potencial ação termoterápica, muito visada na terapia do câncer (HUANG et al. 2006).

Um estudo recente publicado por Wang e colaboradores (2011) demonstrou a ação anticancerígena seletiva de nanobastões de ouro revestido com albumina sérica bovina (BSA) causando morte de células tumorais através de danos mitocondriais. Esse grupo reportou que apenas nas células tumorais os nanobastões eram liberados no citoplasma e direcionados para a mitocôndria.

A mitocôndria é uma organela presente no citoplasma responsável por diversos processos metabólicos, incluindo além da respiração celular, o controle da morte celular, dos níveis de cálcio e à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). A respiração celular é o fenômeno encarregado da produção da maior parte da energia celular na forma de moléculas de ATP. Este processo ocorre principalmente em razão do acoplamento entre o fluxo de elétrons nos complexos presentes na cadeia respiratória, que leva ao bombeamento de prótons para o espaço

intermembranar, e a ATP-sintase, que utiliza a força próton-motriz, gerada pelo retorno desses prótons, para a síntese de ATP (KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 2001; NELSON; COX, 2014; NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

A ação dos nanobastões de ouro sobre a mitocôndria ainda não está esclarecida. Dessa forma o presente estudo propõe a avaliar os efeitos dos nanobastões de ouro na bioenergética mitocondrial a fim de elucidar o mecanismo pelo qual estes atuam.

1.1 OBJETIVO

Preparar nanomateriais híbridos à base de nanobastões de ouro conjugados à albumina séria bovina e realizar estudos bioquímicos a fim de elucidar o seu mecanismo de ação na integridade mitocondrial.

1.1.1 Objetivos específicos

- i. Sintetizar nanobastões de ouro;
- ii. Modificar a superfície dos nanobastões pela conjugação com BSA;
- iii. Caracterizar as nanoestruturas quanto ao seu tamanho, morfologia e ressonância de plásmon de superfície;
- iv. Avaliar o efeito dos nanobastões na integridade mitocondrial: a) respiração mitocondrial no complexo I; b) potencial elétrico de membrana mitocondrial; c) inchamento mitocondrial;
- v. Avaliar o efeito dos nanobastões no estado redox: a) produção de espécies reativas de oxigênio (EROS); e b) produção de H₂O₂;
- vi. Investigar a morfologia mitocondrial através da microscopia eletrônica de transmissão.

2 SÍNTESE, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE NANOBASTÕES DE OURO

2 SÍNTESE, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE NANOBASTÕES DE OURO

2.1 NANOMATERIAIS

Matéria pode ser definida como tudo aquilo que tem massa e volume. A massa se refere a quantidade da matéria de um determinado objeto ao passo que o volume alude ao total de espaço ocupado por este. Os vários tipos de matérias podem ser discriminados através de suas diferentes propriedades físicas (ponto de fusão, ponto de ebulição, densidade) e químicas (reatividade, oxidação, redução) (MONGILLO, 2007).

Toda matéria pode ser considerada um material em potencial, com suas características e aplicações. A linha divisória que pode tornar um objeto em um material corresponde ao momento em que uma de suas propriedades (ópticas, mecânicas, catalíticas, magnéticas, elétricas, etc.) lhe confira uma função específica. Os materiais são de grande importância na vida humana, principalmente, por possuírem propriedades que os tornam úteis em produtos, dispositivos, estrutura e máquinas (ZARBIN, 2007).

Na busca por materiais com novas características e propriedades, destacam-se aqueles que estão em escala nanométrica. Estes materiais possuem propriedades distintas de sua forma mássica ou macroscópica e são denominados nanomateriais, por apresentarem uma de suas dimensões na escala nanométrica, assumindo um tamanho crítico característico, que se caracteriza por ser a fronteira em que alguma de suas propriedades pode ser alterada (ZARBIN, 2007).

A unidade da escala nanométrica (1 nanômetro) é equivalente a bilionésima parte do metro. Em uma comparação não substancial, pode-se estimar que 1 nanômetro está para 1 metro assim como uma bola de futebol está para o planeta terra (BOULEVARD, 2008).

O interesse científico no estudo dos materiais em nanoescala ganhou importância significativa no final do século XX. Em 1959, Richard Feynman, um físico norte-americano, proferiu uma palestra intitulada “Há muito espaço lá embaixo” apontando que um dia seria possível manipular os átomos individualmente. Esse marco é conhecido, por muitos, como o ponto inicial da Nanociência e Nanotecnologia (GALEMBECK et al., 2003).

A Nanociência e a Nanotecnologia estão fundamentadas no fato de que as propriedades dos materiais são fortemente dependentes do tamanho e da forma de suas partículas. Dessa forma, as propriedades físicas, químicas e biológicas da matéria, comumente, diferem quando atingem a escala. Isso se deve, em parte, a maior área superficial por unidade de volume dos nanomateriais (MONGILLO, 2007).

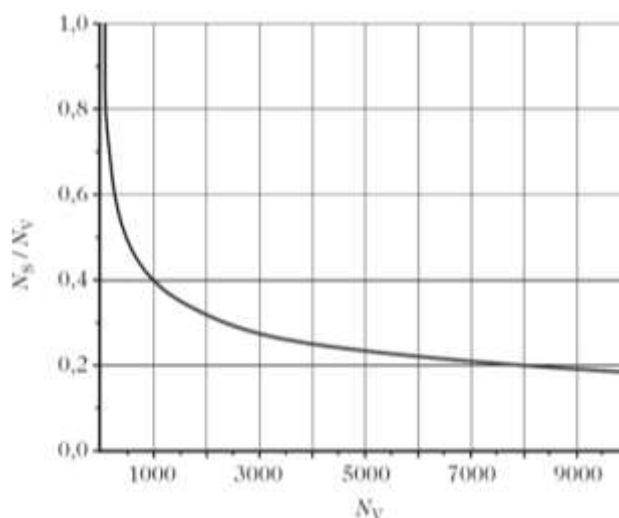
Quando um material é de tal forma reduzido, a proporção dos átomos em sua superfície passa a ser considerável. Esta proporção pode ser estimada para os metais de transição através da seguinte equação:

$$\frac{N_s}{N_v} \approx \frac{1}{2R} \quad \text{eq. (1)}$$

onde N_v é o total de átomos da partícula, N_s é a quantidade de átomos em sua superfície e R o seu raio em nanômetros. Conforme a equação, o valor, em percentual, da proporção dos átomos da superfície de uma partícula aumenta à medida que o seu tamanho diminui como pode ser previsto na curva representativa abaixo (Fig. 1) (BRÉCHIGNAC; HOUDY; LAHMANI, 2007).

A elevada área superficial das nanopartículas, decorrente desta alta proporção de átomos de superfície, as tornam termodinamicamente instáveis causando uma tendência natural de aglomeração e crescimento. Devido a isso, a síntese de materiais nanoestruturados com elevada homogeneidade, estabilidade e reprodutibilidade é um desafio para a comunidade científica (GRZELCZAK et al., 2008; SUN; YOUNAN, 2002).

Figura 1 – Proporção de átomos na superfície de uma partícula esférica com número total de átomos (N_V) e átomos na superfície (N_S)



Fonte: BRÉCHIGNAC; HOUDY; LAHMANI, 2007

Atualmente, muita produção científica (SUN; XIA, 2002; LU et al. 2011) tem sido desenvolvida acerca deste tema, com um enfoque maior na preparação, caracterização e aplicações dos nanomateriais, mas ainda existe uma longa lista de temas inexplorados.

2.2 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

Quando se deseja fabricar nanopartículas para uma determinada aplicação deve-se compreender qual é a propriedade que elas devem possuir para que sejam usadas nesta aplicação. Com base nisso, as características estruturais (tamanho, forma, cristalinidade) e químicas (composição, superfície, interface) são fatores importantes que devem ser considerados para a escolha do melhor método de preparação capaz de produzi-las (EDELSTEIN; CAMMARATRA, 1996; ZARBIN, 2007).

Nanopartículas podem ser preparadas a partir de duas diferentes abordagens: *top-down* (de cima para baixo) e *bottom-up* (de baixo para cima) de acordo com os processos envolvidos na sua produção (Fig. 2). A primeira é uma abordagem baseada em métodos físicos que utiliza parâmetros experimentais externos (luz ultravioleta, raios X, feixes de elétrons) para criar estruturas nanométricas a partir de partículas de dimensões maiores. *Optical lithography*, *E-beam lithography*, *Soft lithography*,

Nanoimprint lithography e Sonólise são exemplos de métodos usados para fabricação de nanomateriais via *top-down* (BISWAS et al. 2012).

Figura 2 – Principais abordagens na preparação de nanomateriais



Fonte: AUTOR, 2016 e Google Imagens, 2016

A segunda abordagem (*bottom-up*) normalmente envolve processos químicos por via úmida. Nestes casos as nanopartículas são obtidas a partir de precursores atômicos ou moleculares que se ligam quimicamente (DURÁN et al. 2007). A abordagem *bottom-up* desempenha um papel importante na fabricação e processamento de materiais nanoestruturados. Através dela é possível obter sistemas com alto grau de controle e homogeneidade. Isso ocorre porque a abordagem *bottom-up* é impulsionada principalmente pela redução da energia de Gibbs na etapa do crescimento, de modo que as nanopartículas formadas sofrem uma agregação espontânea em presença de agentes passivantes até o tamanho desejado (nanométrico) (MATOS, 2012).

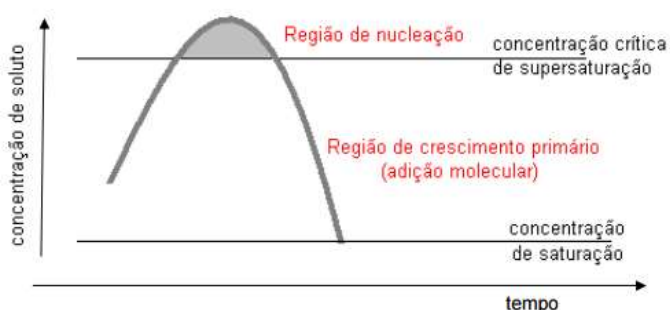
A pesquisa em nanomateriais tem avançado muito acerca do conhecimento e no desenvolvimento de estratégias de síntese de nanopartículas. Atualmente, muitas novas rotas vêm sendo descobertas, mas o principal desafio ainda é obter controle no processo de síntese. Metodologias via *bottom-up* são capazes de gerar um sistema nanoestruturado mais homogêneo, devido a maior facilidade de se controlar o tamanho e a morfologia das partículas. Em virtude disso, esta abordagem química usualmente é a mais utilizada (FELDHEIM; FOSS, 2001).

Nucleação e Crescimento

A precipitação de um sólido, a partir de um precursor em solução, é uma técnica comumente aplicada para a fabricação de nanopartículas. De maneira resumida, o processo envolve reações em solução (aquosa ou não) contendo um sal solúvel ou suspenso. Quando a solução atinge o ponto de supersaturação, um precipitado é formado através de um processo conhecido como nucleação (Fig. 3). A nucleação se refere a formação de um núcleo meta estável (EDELSTEIN; CAMMARATRA, 1996).

Após a formação, o núcleo pode se redissolver ou passar por um processo de crescimento que normalmente ocorre por difusão. Neste crescimento, o gradiente de concentração e a temperatura são importantes fatores que determinam a velocidade do crescimento dos núcleos. Em uma condição ideal, onde são formadas partículas monodispersas e não aglomeradas, os núcleos devem ser formados ao mesmo tempo de maneira que a etapa subsequente de crescimento não ocorra ao mesmo tempo da nucleação (EDELSTEIN; CAMMARATRA, 1996).

Figura 3 – Etapas de nucleação e crescimento na formação de nanopartículas de acordo com a concentração do soluto



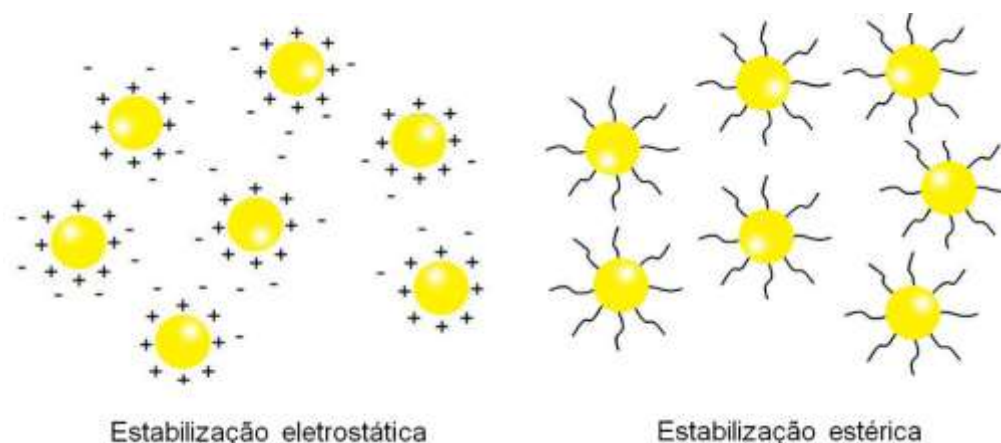
Fonte: Da SILVA, 2010

Independentemente do método utilizado para preparação, o controle do crescimento e a manutenção do sistema em escala nanométrica é uma etapa crítica na obtenção de partículas uniformes. Devido ao seu pequeno tamanho, a relação área de superfície e volume (A/V) é muito alta impulsionando as nanopartículas a se aglomerarem através de um processo conhecido como maturação de Ostwald. Este processo pode ser evitado através do uso de diferentes estabilizantes que interagem fortemente com a superfície, reduzindo o contato direto entre as nanopartículas (SCHMID, 2005).

2.3 ESTABILIZAÇÃO

Nanopartículas são termodinamicamente instáveis, dessa forma elas precisam ser estabilizadas a fim de diminuir a agregação e crescimento desordenado. A estabilização pode ser realizada de duas formas diferentes: estabilização eletrostática (inorgânica) e estabilização estérica (orgânica) (Fig. 4) (AIKEN III; FINKE, 1999).

Figura 4 – Métodos de estabilização de nanopartículas



Fonte: AUTOR, 2016

A estabilização eletrostática ocorre através da repulsão elétrica de nanopartículas externamente carregadas. A presença de íons adsorvidos na superfície de partícula metálicas, por exemplo, é capaz de criar uma dupla camada elétrica que resulta em uma força de repulsão de natureza coulômbica entre as partículas individuais. A estabilização estérica, por outro lado, é resultado da adição de agentes volumosos (compostos orgânicos) à superfície da partícula. Esses agentes são capazes de formar uma camada de proteção fornecendo uma barreira mecânica que previne a aproximação entre as superfícies das partículas. Uma terceira forma de estabilização (estérica-eletrostática) pode ser aplicada pela combinação de ambos processos eletrostático e estérico (AIKEN III; FINKE, 1999).

Nanomateriais metálicos têm atraído a atenção de vários grupos de pesquisa, principalmente devido a suas propriedades ópticas e eletrônicas diferenciadas. As nanopartículas de metais nobres, como ouro, em especial, apresentam uma resposta óptica associada aos plámons de superfície na região do ultravioleta e visível. Essas características permitem ampliar ainda mais seu espectro de aplicações.

2.4 OURO

Considerado um dos primeiros metais manipulados e utilizados pelo homem, o ouro tem sido empregado desde a antiguidade como item de reserva de valor. Este elemento de número atômico 79 é um metal de transição de baixa reatividade, utilizado atualmente em diversas aplicações ópticas, eletrônicas, biomédicas e industriais (JUNQUEIRA; SILVA; GUERRA, 2012).

Os primeiros empregos do ouro nanoparticulado esteve relacionado a questões de ornamentação, principalmente para a obtenção de vidros coloridos. Um exemplo clássico trata-se de uma relíquia do Império Romano (século IV d.C), a taça de Licurgo (Fig. 5), feita de vidro impregnado com nanopartículas de ouro e prata. Devido as propriedades ópticas desse objeto, observa-se que quando uma fonte de luz é posicionada em frente a taça, ela reflete a coloração verde, todavia se a fonte de luz for posicionada dentro da taça, ela é capaz de transmitir a cor vermelha (LOUIS; PLUCHERY, 2014).

Figura 5 – Taça de Licurgo

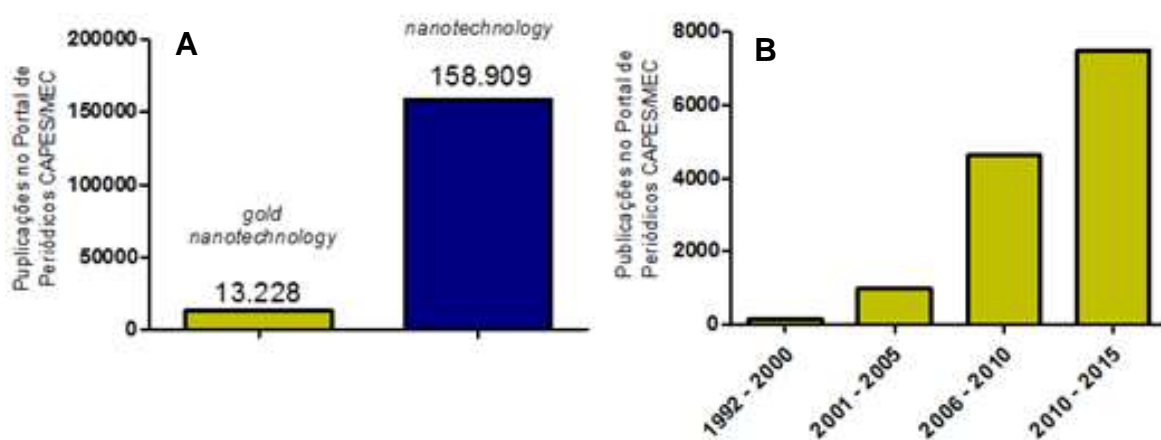


Fonte: PLUCHERY; LOUIS, 2014

O dicroísmo da taça de Licurgo ocorre como consequência da interação das nanopartículas com a luz em um fenômeno conhecido como ressonância de plásmon de superfície (RPS), uma propriedade óptica característica de nanopartículas metálicas (MONTERO, 2013).

O autor deste trabalho em 29 de setembro de 2016 pesquisou a quantidade de publicações no Portal de Periódicos CAPES/MEC utilizando as palavras-chaves *gold* e *nanotechnology*. Surpreendentemente, a associação dessas palavras conta com cerca de 8,32% das publicações quando comparadas a todas as publicações encontradas com o termo *nanotechnology* (Fig. 6A).

Figura 6 – Número total de publicações com os termos nanotechnology e gold associado a nanotechnology no portal de periódicos CAPES/MEC



Fonte: AUTOR, 2016

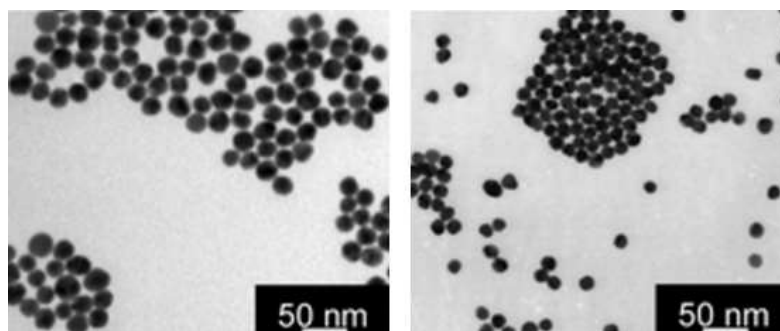
Quando as mesmas palavras são avaliadas em função do tempo (intervalo de 5 anos), desde a primeira aparição no portal (1992), é possível observar um crescente aumento no número de publicações com a combinação destas palavras-chaves (Fig. 6B), demonstrando a grande relevância deste tema.

2.5 PRINCIPAIS MÉTODOS DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

A síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) com diferentes formas e tamanhos já está bastante consolidada na literatura, seja em uma matriz aquosa ou orgânica. Em uma típica síntese, um sal de ouro sofre redução pela ação de uma gente redutor levando ao processo de nucleação e formação das nanopartículas. Um agente de superfície é comumente adicionado a fim de promover a estabilização coloidal.

O método de Turkevich e colaboradores (1954) é a rota de síntese mais frequentemente utilizada para a preparação de nanopartículas esféricas (Fig. 7) de ouro (~35 nm). Através deste, o sal de ouro (AuCl_3) sofre redução pelo citrato trissódico sob ação da temperatura. O citrato trissódico, carregado negativamente, também atua como agente estabilizante durante o processo de nucleação, impedindo a aglomeração das partículas por efeito eletrostático (JI et al. 2007).

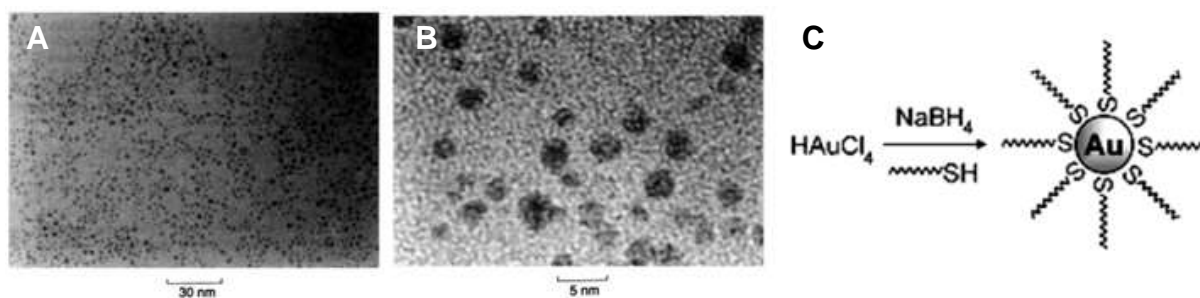
Figura 7 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas esféricas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich



Fonte: JI et al. 2007

Nanopartículas esféricas (Fig. 8A e 8B) de ouro também podem ser sintetizadas em meio orgânico por meio de uma síntese bifásica reportada por Brust e colaboradores (1994). Inicialmente, íons AuCl_4^- são transferidos da fase aquosa para orgânica pela adição de brometo de tetraoctilamônio (TOABr). Após a transferência de fase, NaBH_4 é adicionado à solução orgânica promovendo a redução do ouro e formação das partículas (Fig. 8C). Para evitar a aglomeração do sistema, dodecanotiol é adicionado. Este agente de superfície atua estabilizando o sistema por impedimento estérico.

Figura 8 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de (A) e (B) nanopartículas esféricas sintetizadas pelo método de Brust e (C) esquema de síntese



Fonte: BRUST et al. 1994

Nanopartículas esféricas são as mais estáveis termodinamicamente e, por isso, são de mais fácil obtenção. Isso se deve a menor reatividade destas partículas em virtude do seu menor potencial de superfície quando comparada às demais formas. Todavia, dependendo da concentração da fonte metálica e da presença de compostos

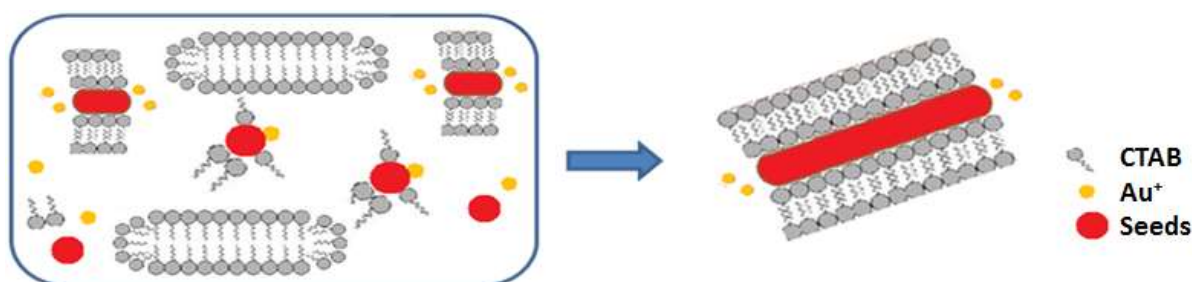
químicos, ditos agentes direcionadores de crescimento, outras morfologias podem ser obtidas (tetraedros, cubos, prismas, cilindros, estrelas, discos) (Da SILVA et al. 2013).

2.6 NANOBASTÕES DE OURO

Dentre todas as morfologias possíveis para nanopartículas de ouro, os nanobastões (AuNRs) tem recebido destaque devido a suas propriedades ópticas particulares, que os lançam como potencial material para diversas aplicações.

A rota sintética mais utilizada para a síntese de nanobastões foi descrita por Jana e Murphy (2001). Esse método, conhecido como *Seed Mediated*, envolve duas soluções: solução semente e solução crescimento. Na solução semente, a fonte de ouro (HAuCl_4) é reduzida por um agente redutor forte (NaBH_4), em presença de brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr), iniciando um processo de nucleação em que nanopartículas de 3,5 a 4,0 nm de diâmetro são formadas, as sementes. Na solução de crescimento, a mesma fonte de ouro (AuCl_3) sofre redução de um agente redutor moderado (ácido ascórbico) em presença de CTABr e nitrato de prata. A etapa final é a adição das partículas sementes na solução de crescimento promovendo a formação de AuNRs (Fig. 9). Em função das condições de síntese, AuNRs com diferentes razões de comprimento e largura podem ser obtidos (Da SILVA et al. 2013).

Figura 9 – Dinâmica de formação de nanobastões de ouro pelo método mediado por semente.



Fonte: Da SILVA, 2014

A presença de um agente direcionador de crescimento no método mediado por semente é de extrema importância para o crescimento dos nanobastões de ouro. O CTABr é o surfactante mais utilizado nesse processo, ele é capaz de formar uma bicamada sob as facetas laterais dos nanobastões que direcionam o crescimento nas

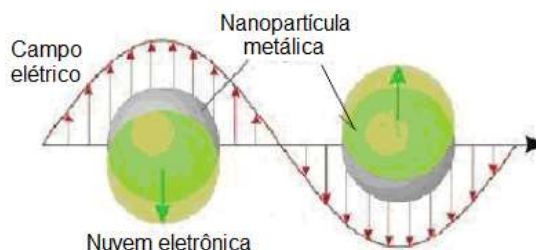
pontas (Fig. 9). Todavia a presença desta camada de revestimento de CTABr confere aos AuNRs uma alta toxicidade frente a sistemas biológicos (WANG et al. 2008).

2.7 PROPRIEDADES ÓPTICAS

As intrigantes propriedades ópticas das nanopartículas de ouro, como a sua coloração intensa e dicroísmo, são atribuídas a sua interação singular com a luz incidente (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2009)

Quando a luz interage com partículas, muito menores que o comprimento de onda incidente, é capaz de induzir a formação de um dipolo através da oscilação coletiva dos elétrons na superfície metálica (Fig. 10). Para sair desta condição energeticamente desfavorável, surge uma força restauradora fazendo com que os elétrons oscilem ordenadamente. Este fenômeno é conhecido como Ressonância de Plásmon de Superfície (RPS) (BONIFÁCIO, 2006; BOHREN, 1983).

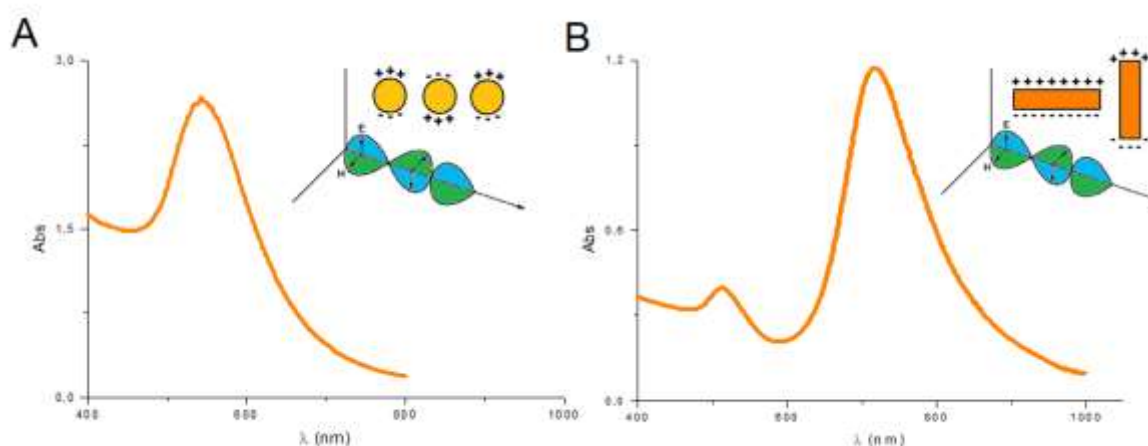
Figura 10 – Interação da luz com uma nanopartícula esférica promovendo a oscilação coletiva dos elétrons



Fonte: adaptada de Da SILVA, 2014

A RPS induz uma forte absorção da luz na região do ultravioleta e visível do espectro, razão que explica as colorações características de sistemas metálicos coloidais. Para nanopartículas de ouro, as bandas de absorção da RPS aparecem na região do visível, o que favorece sua caracterização (Da SILVA, 2014) (Fig. 11).

Figura 11 – Bandas correspondentes à ressonância de plásmon de superfície de nanopartículas de ouro (A) esféricas e (B) bastões



Fonte: adaptada de Da Silva, 2014

Uma vez que as bandas de absorção das nanopartículas são reflexo da oscilação coletiva dos elétrons em sua superfície (RPS), quando modificamos o tamanho ou a forma da partícula, as bandas de plasmon também são modificadas. A Figura 11A demonstra o espectro característico de uma nanopartícula esférica, que apresenta apenas uma banda de plasmon, devido a formação do campo eletromagnético unidirecional em sua superfície. Em contrapartida, nanopartículas anisotrópicas, como bastões, tendem a apresentar mais de uma banda de absorção devido a oscilação dos elétrons em mais de uma direção (Fig. 11B) (PEREIRA, 2009).

Diferentemente das esferas, os nanobastões de ouro exibem uma banda de plásmon de superfície na região próxima do infravermelho. Isso ocorre porque a excitação do plásmon de superfície ao longo do eixo longitudinal do bastão induz uma banda de absorção mais forte em comprimentos de ondas maiores (Da SILVA et al. 2013).

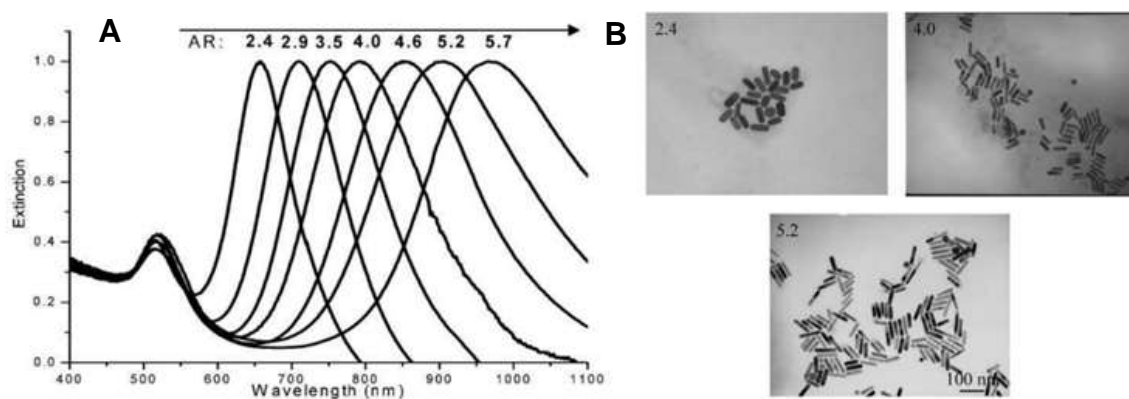
De acordo com a teoria de Gans, o comprimento de onda da absorção máxima da RPS (λ_{\max}) é linearmente proporcional a razão comprimento/largura (R) para partículas elipsoides (ou abastoadas) em solução aquosa conforme a equação 2 (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; PÉREZ-JUSTE, 2005):

$$\lambda_{\max} = 95R + 420 \quad \text{eq. (2)}$$

Sendo assim a banda de absorção de plásmon longitudinal dos nanobastões pode ser facilmente deslocada para comprimentos de ondas maiores aumentando a

razão comprimento/largura (Fig. 12). Trata de uma ferramenta muito útil, por exemplo, em aplicações biomédicas, pois essas partículas podem ser excitadas com luz na região do infravermelho, que tem um bom grau de penetração em tecidos humanos. O mesmo não ocorre para as nanoesferas que, para alcançarem a região próxima do infravermelho, precisariam aumentar seu tamanho (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; HUANG et al. 2015).

Figura 12 – Espectros de UV-Vis (A) de nanobastões com diferentes taxas de proporção e (B) suas respectivas micrografias de MET



Fonte: HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009

2.8 APLICAÇÕES

Os nanobastões de ouro apresentam propriedades ópticas singulares, tais como a presença de uma banda de extinção distinta nas regiões do visível e do infravermelho próximo (NIR), decorrente da RPS longitudinal. Essa propriedade permite o uso dessas partículas em catálise, eletrônica e óptica não-linear. A facilidade de modificação química de sua superfície amplia ainda mais seu espectro acerca das aplicações biológicas e biomédicas (NIIDOME et al. 2006).

Catálise

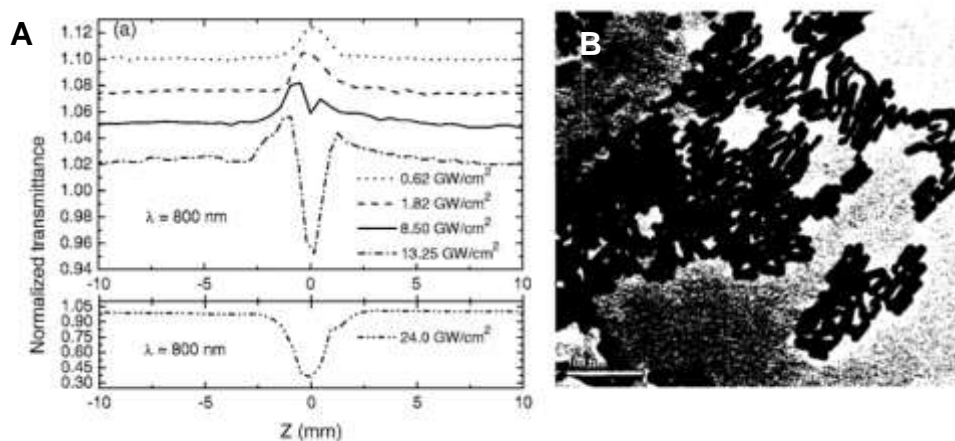
O ouro é considerado um elemento nobre e embora sua superfície seja incapaz de adsorver a maioria das moléculas na fase gasosa, tem-se descoberto que quando em escala nanométrica, seja em solução coloidal ou suportados, podem atuar como catalisadores até mesmo a temperatura ambiente (LOPEZ; NORSKOV, 2002). Nanopartículas de ouro tem sido amplamente utilizadas como catalisadores em

diversas reações químicas com um grande destaque para oxidação de monóxido de carbono (TURNER et al. 2008). Em 2008, Wang e colaboradores desenvolveram um catalisador bimetálico à base de nanobastões de ouro decorados com platina que apresentaram uma alta atividade na reação de eletro-oxidação do ácido fórmico.

Óptica não-linear

Melo e colaboradores (2015) estudaram as propriedades termo-ópticas e ópticas não-lineares em amostras de cristal líquido funcionalizadas com nanobastões de ouro. Neste estudo, eles demonstraram que a introdução dessas partículas afetou os parâmetros termo-ópticos dependentes da temperatura. Outro estudo reportado por Elim e colaboradores (2006) demonstrou que a transmitância de uma solução de nanobastões de ouro diminui à medida que a irradiação do laser incidente aumenta (Fig. 13). Essa capacidade de apresentar alta transmitância quando a baixas intensidades de luz incidente e baixa transmitância para altas intensidades, torna os nanobastões de ouro candidatos a limitadores ópticos que podem ser usados como protetores contra danos em sensores ópticos (ELIM et al. 2006).

Figura 13 – Transmitância de nanobastões de ouro (A) frente a diferentes potências de laser e (B) respectivas imagens de MET



Fonte: ELIM; YANG; LEE; MI; JI, 2006

Biossensores

A nanociência também tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento de inovações biotecnológicas como na elaboração de novos biossensores. Biossensor é um dispositivo capaz de medir seletivamente

determinadas substâncias. Nanobastões de ouro tem sido largamente utilizados para este fim.

Zhang e colaboradores (2009) utilizaram nanobastões de ouro para criar um biossensor seletivo para glicose. A imobilização da enzima glicose oxidase na superfície desta partícula foi capaz de aumentar a resposta do eletrodo em 10 vezes, alcançando um limite de detecção de 2×10^{-5} M (REN et al. 2009). Nanobastões de ouro decorados em nanotubos de carbono também demonstraram ser biossensores ativos para detecção de cisteína (8,25 nmol/L), um importante aminoácido presente em proteínas naturais (SILVA et al. 2013).

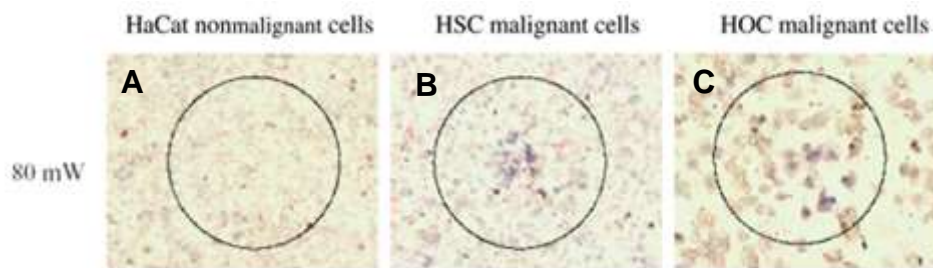
Dentro do ramo da nanobiotecnologia alimentícia, Xu e colaboradores, em 2013 elaboraram um biossensor promissor à base de AuNRs para detecção de aflatoxina B1, uma micotoxina produzida pelo microrganismo *Aspergillus flavus* capaz de causar grandes danos mesmo quando em baixas concentrações. Este nanobiossensor demonstrou ser seletivo, sensível e simples fornecendo uma alternativa para a triagem de toxinas em produtos alimentícios.

Terapia fototérmica

Outra aplicação, em que se toma proveito das propriedades ópticas singulares de AuNRs, é seu uso em termoterapia contra o câncer. De fato, AuNRs são capazes de absorver na região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético, transferindo parte dessa energia absorvida na forma de calor para sua vizinhança, o que pode resultar na morte de células (ALKILANY et al. 2012).

Huang et al. (2006) demonstraram a eficiência e a seletividade de nanopartículas de ouro na forma de bastões (AuNRs) *in vitro* na terapia fototérmica (Fig. 14). Em seus estudos, realizaram exposições, na presença de AuNRs, sobre três linhagens de células diferentes: células epiteliais normais (HaCat), e duas linhagens de células epiteliais bucais malignas (HOC 313 clone 8 e HSC 3). Os resultados demonstraram um alto grau de seletividade dos AuNRs para as linhagens de células cancerosas. Quando uma radiação gerada por um laser a potência de 80 mW foi aplicada, ocorreu destruição celular das linhagens de células tumorais, contudo não houve morte de células normais, indicando que à média potência, a termoterapia com o uso de AuNRs tratados seria seletiva a ponto de causar destruição de células cancerosas e impactos negligentes nos tecidos saudáveis (HUANG et al. 2006).

Figura 14 – Terapia fototérmica com o uso de AuNRs em (A) células normais e (B) e (C) tumorais. O círculo representa a área de ação do laser



Fonte: HUANG et al. 2006

Carreadores

A seletividade é um fator extremamente relevante, principalmente tratamentos em que o agente terapêutico é capaz de causar fortes efeitos colaterais. Os nanocarreadores de fármacos, por causarem impacto nas células alvo poupando as células saudáveis, se lançam como uma alternativa para otimização do tratamento. Azevedo (2002) listou 6 vantagens dos sistemas de carreamento quando comparados a outros de dosagem convencional: i) maior eficácia terapêutica, com liberação controlada do fármaco; ii) diminuição significativa da toxicidade; iii) evita bio-inativação do fármaco; iv) administração segura, sem reações inflamatórias locais; v) direcionamento a alvos específicos sem imobilização de espécies bioativas; e vi) tanto substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas podem ser incorporadas.

Nanobastões de ouro são ótimos candidatos para o transporte de várias substâncias, pois além da facilidade no processo de síntese, sua superfície pode ser facilmente modificada. Essas substâncias podem ser desde fármacos de pequeno peso molecular até grandes biomoléculas, como proteínas, DNA e RNA. Suas propriedades ópticas de absorção de energia em determinados comprimentos de onda podem ser utilizadas como ferramenta de liberação do princípio ativo pelo estímulo externo via radiação (HAN et al. 2008).

Agentes terapêuticos

Alguns trabalhos têm sugerido que as nanopartículas de ouro possuem uma toxicidade intrínseca e seletiva. Isso se deve, em parte, a sua reatividade química, quando em tamanho nanométrico, que pode ser capaz de causar danos oxidativos em células-alvo. Em razão disso, as nanopartículas por si só, podem ser utilizadas como agentes terapêuticos (ALKILANY et al. 2012).

Trabalhos recentes realizaram um estudo comparativo de absorção e transporte intracelular de AuNRs revestidos com proteína em carcinoma epitelial alveolar humano e células normais, verificando-se que essas nanoestruturas eram capazes de se acumular seletivamente em mitocôndrias de células cancerígenas, causando a morte da célula (WANG et al. 2011), se tornando assim uma ótima estratégia para o desenvolvimento de um novo agente quimioterápico.

2.9 BIOCONJUGAÇÃO

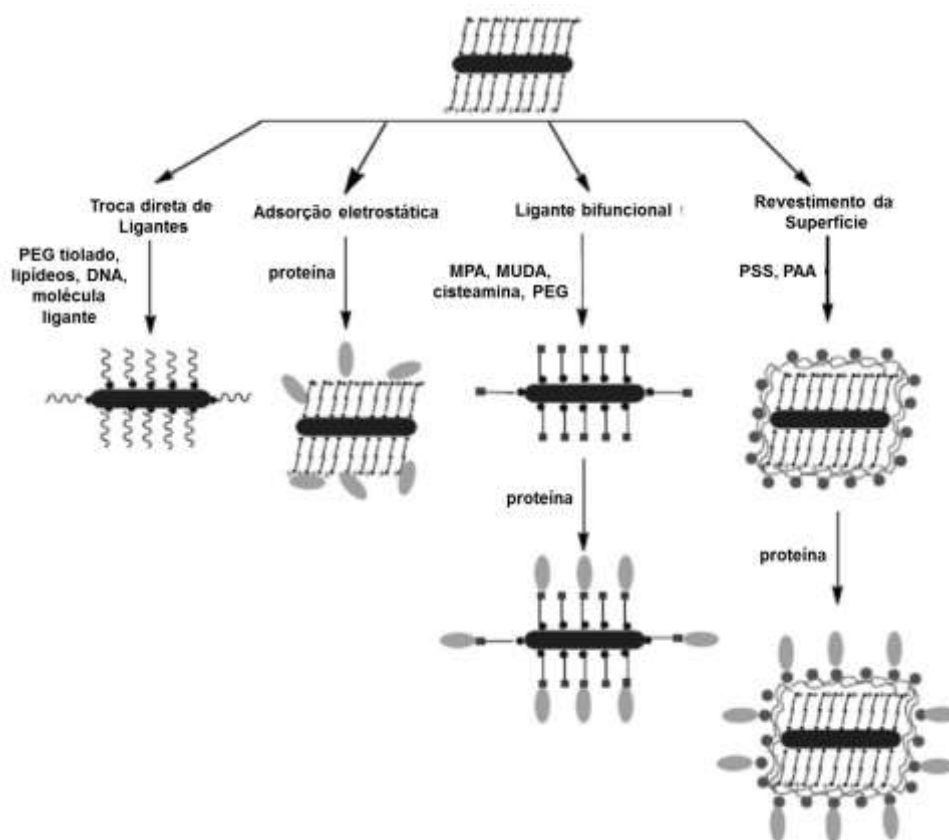
Como já mostrado, o uso de nanobastões em aplicações biomédicas tem se mostrado bastante promissor. Todavia antes de atingir uma fase clínica é preciso entender os potenciais riscos de seu uso na saúde humana e no ambiente. As moléculas de CTABr oriundas do processo de síntese apresentam uma alta toxicidade. O CTABr é uma espécie química com característica anfifílica (“cabeça” hidrofílica e “cauda” hidrofóbica) capaz de causar lise das principais membranas biológicas (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; HEYDARIAN et al. 2013).

Uma vez que as moléculas de CTABr livres podem ser separadas por técnicas de centrifugação ou diálise, se espera que o uso de nanobastões *in vivo* apresente certo grau de segurança. Uma estratégia adotada para o mascaramento do CTABr residual preso a superfície do nanobastão é a modificação de sua superfície através da adição de moléculas biocompatíveis (bioconjugação) (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009).

A literatura tem reportado diversos agentes “mascaradores” para nanobastões de ouro. O uso de fosfatidilcolina (FC) (TAKAHASHI et al. 2006), cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDAMAC) (HAUCK; GHAZANI; DR, 2008), ácido poli(4-estireno sulfônico) (PSS) (HAUCK; GHAZANI; DR, 2008), polietilenoglicol (PEG-SH) (NIIDOME et al. 2006) e a albumina sérica bovina (BSA) proveram uma diminuição significativa da sua toxicidade.

Segundo Huang e colaboradores (2009), a natureza da interação química entre as moléculas passivantes e a superfície do ouro, usualmente se dá através de quatro metodologias diferentes: i) troca direta de ligantes, ii) adsorção eletrostática, iii) adição de um ligante bifuncional (crosslink) e iv) revestimento da superfície (Fig. 15).

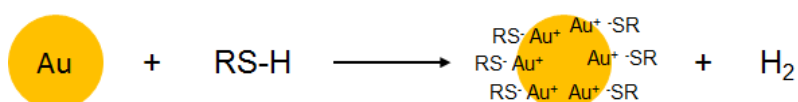
Figura 15 – Ilustração dos diferentes métodos de bioconjugação de nanobastões de ouro



Fonte: HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009

A principal metodologia utilizada para modificação da superfície de nanobastões de ouro é através de sua interação com a função orgânica tiol (R-SH) ou dissulfeto (R-SS-R). Já é sabido que grupos tíóis interagem fortemente com a superfície metálica de ouro (BARNGROVER; AIKENS, 2013). Matthiensen e colaboradores (2013), através de um estudo de cromatografia gasosa, perceberam que, de fato, grupos tíóis oxidam os átomos de ouro da superfície das nanopartículas liberando gás hidrogênio, formando grupos sulfetos fortemente aderidos a superfície da partícula, conforme indicado na figura 16.

Figura 16 – Esquema da equação química responsável entre a interação Au-S



Fonte: AUTOR, 2016

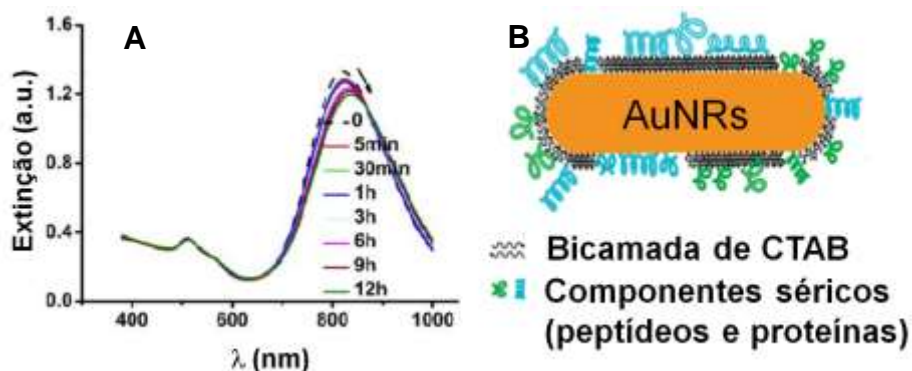
Componentes séricos (presentes no plasma sanguíneo), tais como a proteína albumina, têm sido amplamente utilizados em estratégias de bioconjugação. Eles podem se ligar à superfície das nanopartículas de ouro através de adsorção eletrostática ou interação hidrofóbica com os agentes de superfície ou através de uma ligação direta a superfície do ouro (WANG et al. 2011).

Muitos estudos têm elucidado o uso de albumina como agente de bioconjugação de nanobastões de ouro. A albumina sérica consiste em uma proteína com M_T 65 K (humana) constituída por 585 aminoácidos. Um total de 61% das sequências de aminoácidos conhecidas desta proteína são conservadas entre bovinos, ratos e humanos. Suas sequências de aminoácidos são compostas por 17 pontes dissulfeto e um grupo tiól livre (Cys 34) (HE; CARTER, 1992).

Shaw III (1989) estudando a bioquímica envolvida na ação de complexos de ouro com atividade anti-artrite, demonstrou a alta afinidade do resíduo de cisteína 34, presente na albumina, pelo ouro I (Au^+). Hoje, já se sabe que a interação de grupos tióis terminais, como o presente na cisteína, ocorre através do mecanismo elucidado por Matthiensen e colaboradores.

Wang e colaboradores (2011) evidenciaram que a presença da proteína sérica albumina na superfície de nanobastões de ouro (Fig. 17B) era capaz de alterar o plásmon de superfície dessas partículas. Durante a incubação com albumina a 10%, a banda de extinção referente ao plásmon de superfície longitudinal sofreu um deslocamento batocrômico. A adsorção dos componentes séricos na superfície do ouro induziu um deslocamento de 20 nm para a região do infravermelho-próximo (Fig. 17A).

Figura 17 – (A) Deslocamento na região do infravermelho próximo dos nanobastões de ouro incubados com BSA e (B) esquema de interação



Fonte: WANG et al. 2011

Este mesmo grupo estudando o efeito antitumoral seletivo de nanobastões de ouro revestidos com a proteína albumina, relata a grande vantagem do uso de componentes séricos como agentes passivantes, pois proporcionam a internalização celular destas partículas, que se dá, majoritariamente, via endocitose mediada por clatrina (WANG et al. 2011).

3 CÂNCER E NANOESTRUTURAS

3 CÂNCER E NANOESTRUTURAS

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças de caráter genético provocado a partir do crescimento descontrolado de células, que invadem tecidos e podem se espalhar para diferentes partes do corpo gerando metástases. A projeção mundial para 2020 é que exista mais de 15 milhões de pessoas afetadas com tal patologia. Com o tratamento quimioterápico, atualmente disponível, 99% das drogas administradas tipicamente não chegam ao tumor. Principalmente por esse motivo, existe uma corrida no desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e que sejam menos tóxicos para os pacientes (INCA, 2016; TRAFTON, 2009).

3.1 ONCOGÊNESE

Em um indivíduo jovem, a taxa de nascimento celular é maior que a morte celular, todavia, em um indivíduo adulto, esses dois processos entram em um estado de equilíbrio. Dessa forma, a multiplicação celular precisa ter um dinamismo criteriosamente regulado a fim de responder as necessidades do corpo. Quando, eventualmente, esses controles especiais entram em falência, as células podem passar a se multiplicar indefinidamente formando uma massa celular, o tumor (LODISH et al. 2013).

Muitos estudos indicam que a origem do tumor é fruto de um conjunto de alterações genéticas que levam a transformação progressiva de células normais em células malignas. Hanahan e colaboradores (2000) apresentaram seis alterações essenciais na fisiologia celular que, em conjunto podem levar a formação do tumor: i) crescimento autossuficiente; ii) insensibilidade aos inibidores de crescimento; iii) resistência aos sinais que programam a morte celular (apoptose); iv) potencial de replicação ilimitado; v) promoção da angiogênese sustentada; e vi) invasão de tecidos e desenvolvimento de metástase.

Essas alterações são desencadeadas como consequência de mutações genéticas. As mutações podem ter um efeito dominante, quando somente uma cópia do gene precisa estar mutado, tornando o gene afetado hiperativo (proto-oncogenes), ou as mutações podem ser recessivas. Neste último caso, as duas cópias do gene devem ser perdidas ou inativadas (genes de supressão tumoral) (ALBERTS et al. 2010).

Um tumor pode ser classificado em duas categorias de acordo com a propensão a agressividade de seu crescimento. Tumores benignos crescem localizados sem invasão a tecidos adjacentes. Ao passo que os tumores malignos são capazes de atravessar a lâmina basal que define os limites dos tecidos vizinhos, podendo difundir-se através do sangue para o corpo, estabelecendo áreas secundárias de crescimento (metástase). A esses últimos também é dada a denominação de câncer (WEINBERG, 2008).

3.2 CICLO CELULAR E O CÂNCER

O indivíduo humano adulto é formado por trilhões de células, todas derivadas de uma única célula, o zigoto. A multiplicação dessa única célula é o que permite a formação de todos os tecidos no organismo vivo em um fenômeno conhecido como divisão celular, onde uma única célula mãe é capaz de gerar duas células filhas idênticas (LODISH et al. 2013).

Para que a célula se divida, ela precisa passar por uma série de eventos que constituem o ciclo celular. A regulação deste ciclo é crítica para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares, pois a perda nesse controle pode provocar diversas alterações genéticas. Dessa forma a compreensão do ciclo celular é fundamental para o entendimento de muitas patologias de cunho genético, incluindo o câncer (LODISH et al. 2013).

O ciclo celular é tradicionalmente dividido em quatro fases. A fase mais fácil de ser identificada com um simples microscópio é a *mitose* (fase M), nela ocorre a divisão do núcleo e a célula, de fato, se divide em duas. O intervalo entre duas fases M é chamado de *interfase*. A interfase, embora não demonstre alterações microscópicas significativas, é, do ponto de vista bioquímico, o momento mais crítico do ciclo celular (ALBERTS et al. 2011).

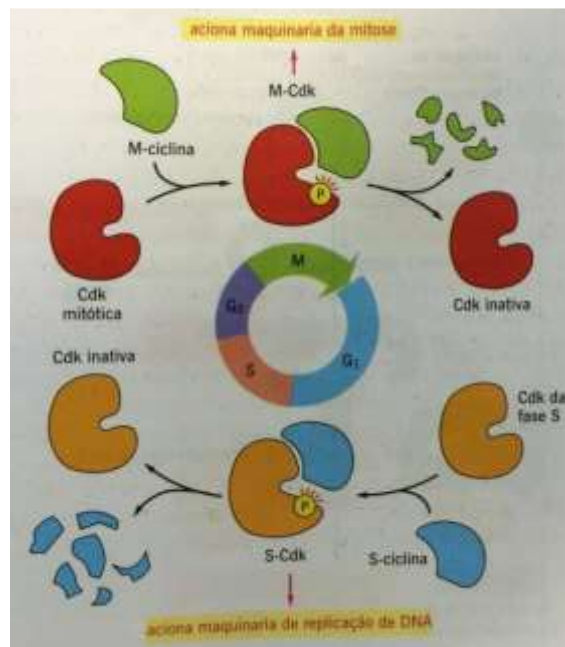
A interfase abrange as três etapas remanescentes do ciclo: i) fase S, onde ocorre a replicação do DNA no núcleo, como pré-requisito para divisão celular; ii) fase G₁, que trata do intervalo entre o final da fase M e o início da fase S; iii) fase G₂, que se insere entre o final da fase S e o início da fase M e iv) fase G₀, quando a célula entra em um estado especializado de repouso (células nervosas, músculo esquelético). Durante as fases G₁ e G₂, a célula está em intenso metabolismo de

transcrição de genes e síntese proteica, provocando um grande aumento do volume celular e do número de organelas (ALBERTS et al. 2011).

Os eventos macromoleculares envolvidos no ciclo celular de células eucarióticas são regulados por proteínas quinases heterodiméricas, as quinases dependentes de ciclinas (Cdk). As concentrações das subunidades reguladoras dessas quinases, as ciclinas, aumentam e diminuem, controlando o ciclo celular (LODISH et al. 2013).

O complexo formado pela ciclina mitótica (ciclina-M) e a Cdk, por exemplo, possui um papel importante no controle do ciclo. A síntese de ciclina-M se inicia imediatamente após a divisão celular e permanece contínua durante a interfase. O aumento da concentração de ciclina-M leva a formação do complexo ativo M-Cdk, que dirige a entrada na fase M (Fig. 18). Ao final da mitose o complexo promotor da anáfase (APC *anaphase promoting complex*) adiciona ubiquitina às ciclinas sinalizando sua degradação pelos proteassomos. Um complexo semelhante, o S-Cdk, quando formado, é capaz de acionar o início da fase S (ALBERTS et al. 2011).

Figura 18 – Papel das proteínas quinases dependentes de ciclina e ciclinas na regulação do ciclo celular



Fonte: ALBERTS, 2010

O ciclo celular é um processo ordenado e especialmente regulado para evitar que mutações deletérias sejam passadas para outras gerações celulares. Os mecanismos moleculares responsáveis por esta regulação ainda são pouco

compreendidos. Todavia, um conjunto de proteínas específicas inibidoras de Cdk é capaz de assegurar que um DNA danificado não se replique e o ciclo celular não se complete (ALBERTS et al. 2010).

O DNA danificado pode provocar o aumento na concentração e atividade da proteína p53, uma proteína reguladora de genes capaz de ativar a transcrição de um gene que codifica uma proteína inibidora de Cdk, chamada p21. A proteína p21 se liga aos complexo S-Cdk, inativando-os e impedindo que eles conduzam o início da fase S. Eventualmente, se a p53 não existir ou estiver defeituosa, o DNA danificado pode ser replicado, conduzindo a um aumento na taxa de mutações, o que pode levar ao desenvolvimento de uma célula cancerosa (ALBERTS et al. 2011).

Uma segunda forma de controle está na fase M para assegurar que as fibras do fuso da célula estão corretamente alinhadas antes da separação dos cromossomos. Se o dano ou anormalidade do DNA ou na formação do fuso são detectados nestes pontos de verificação, a célula é forçada a passar pela morte programada (apoptose) (LODISH et al. 2013).

3.3 TRATAMENTO

O câncer é reconhecido como entidade diagnóstica há muitos séculos, todavia, as primeiras observações de regressão tumoral induzida por droga datam do início da década de 1940 com as mostardas nitrogenadas. Os agentes descobertos nas primeiras décadas da quimioterapia do câncer, tal como as mostardas, interagem com o DNA, inibindo a sua replicação, ou causando danos irreparáveis (SILVA, 2010).

A descoberta de novos agentes a partir de produtos naturais mais convencionais, como o paclitaxel (substância química presente na casca da planta *Taxus brevifolia*), e de agentes semissintéticos, como o etoposído, direcionou a quimioterapia contra o processo proliferativo, se estendendo para novos campos de investigação (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

Com o avanço tecnológico, novos planos de estudos têm sido destinados ao desenvolvimento de novos fármacos que atuem em um alvo molecular. Embora a diversidade de suas aplicações tenha sido ampliada, os agentes antineoplásicos ainda apresentam um índice terapêutico estreito e por isso apresentam um alto potencial de causar efeitos colaterais adversos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

Didaticamente, os antineoplásicos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em: i) agentes alquilantes, ii) agentes antimetabólicos; iii) antibióticos; iv) inibidores das topoisomerasas; v) inibidores dos microtúbulos; vi) derivados da platina; vii) agentes hormonais; viii) inibidores de tirosina cinase; ix) anticorpos monoclonais e x) fatores de crescimento hematopoéticos (SILVA, 2010).

Segundo o INCA, os antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólicos, os antibióticos e os inibidores dos microtúbulos (INCA, 1993).

Os agentes alquilantes, como mecloretamina e a dacarbazina, são compostos capazes de se ligar ao DNA e impedir a separação da dupla fita, boqueando a sua replicação. Os agentes antimetabólicos, por outro lado, são substâncias análogas a constituintes de vias metabólicas importantes. Sua ação, majoritariamente, se dá através da inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese dos componentes essenciais do DNA. O metotrexato, um análogo do ácido fólico, é um dos principais antineoplásicos desta classe (SILVA, 2010). Os fármacos destas duas classes são capazes de causar, dentre outros efeitos, toxicidade gastrointestinal, aplasia germinal, infertilidade permanente, nefropatia e neurotoxicidade aguda.

Os antibióticos são representados por um grupo de substâncias com estrutura química variada que possuem em comum a presença de anéis insaturados capazes de incorporar um excesso de elétrons e produzir radicais livres reativos. O antibiótico doxorrubicina, por exemplo, é um dos mais efetivos agentes utilizados no tratamento de carcinomas da mama, ovário, endométrio, bexiga, tireoide e pulmão. Todavia apresenta diversos efeitos colaterais como a mielossupressão e cardiotoxicidade (SILVA, 2010).

Os agentes inibidores do microtúbulo são capazes de estabilizar os microtúbulos (polímeros de tubulina responsáveis pela formação do citoesqueleto e formação do fuso mitótico na divisão celular) impedindo a reorganização celular e levando a célula a apoptose. Embora esta classe de antineoplásicos venha se destacando, tendo como principal representante o paclitaxel, ainda apresenta diversos efeitos colaterais incluindo neutropenia, neurotoxicidade, náuseas, vômitos e diarreia (SILVA, 2010).

Além do uso de medicamentos (quimioterapia), o tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessária a combinação de mais de uma destas modalidades. O atual

conceito de radioterapia envolve o tratamento no qual se utilizam radiações ionizáveis, invisíveis aos olhos humanos, para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. Na maioria das vezes, o uso da radioterapia está associado ao tratamento conjunto com a quimioterapia (BRADY; PEREZ; HALPERIN, 2008).

Estudos epidemiológicos confirmam que metade dos pacientes com câncer são tratados com radiações e a efetividade desse tratamento na cura tem sido bastante satisfatória. Quando se trata de tumores em estágios terminais, a radioterapia ainda lança mão de seu uso como paliativo, contribuindo para melhoria da qualidade de vida do paciente. Isso se deve, principalmente, pois as aplicações de radiação diminuem o tamanho do tumor, o que causa um alívio na pressão, reduzindo hemorragias, dores, e outros sintomas. Todavia, o fato da fonte de radiação se encontrar fora do corpo pode gerar uma superexposição dos tecidos saudáveis, o que complicará em efeitos colaterais severos (INCA, 2016).

Rádio e quimioterapias convencionais são capazes de destruir células tumorais (PAWLIK & KEYOMARSI, 2004; KAUFMANN & EARNSHAW, 2000), contudo produzem fortes efeitos colaterais (IGNEY; KRAMMER, 2002; EVAN; VOUSDEN, 2001). Os agentes utilizados no tratamento do câncer afetam tanto células neoplásicas como as normais, originando os diversos efeitos adversos. Dessa forma, muito se tem investido no desenvolvimento de novas agentes antitumorais que sejam mais eficazes e menos tóxicos.

3.4 CÂNCER E NANOESTRUTURAS

Nos últimos anos, a introdução bem sucedida de diversos novos produtos a base da nanomedicina na prática clínica e até mesmo no comércio já tem demonstrado resultados positivos da pesquisa fundamental. A tabela 1 apresenta nanomedicamentos aprovados por um ou mais órgãos reguladores em todo o mundo.

Tabela 1: Medicamentos a base de nanomateriais aprovados por um ou mais órgãos

Produto	Nanoplatforma/agente	Indicação	Estatuto	Empresa
Doxil	Lipossoma PEGlado/cloridrato de doxorubicina	Câncer de ovário	Aprovada 11/17/1995 FDA50718	Ortho Biotech (adquirida por JNJ)
Myocet	Doxorubicina lipossomal não-PEGlada	Câncer de mama metastático	Aprovada na Europa e no Canadá, em combinação com ciclofosfamida	Sopherion Therapeutics, LLC in North America e Cephalon, Inc. Na Europa
DaunoXome	Encapsulação líidica de daunorrubicina	Tratamento de primeira linha para pacientes em estágio avançado de HIV-associada a sarcoma de Kaposi's	Aprovada nos EUA	Galen Ltd.
ThermoDox	Encapsulação lipídica de doxorubicina ativada por calor	Câncer de mama, câncer primário de fígado	Aprovado em 2013	Celsion
Abraxane	Nanopartícula de albumina/paclitaxel	Vários tipos de câncer	Aprovada em 01/07/2005 FDA21660	Celgene
Rexin-G	Fosfolípideo/microRNA 122 marcado com proteína alvo	Sarcoma, osteosarcoma, câncer pancreático e outros tumores sólidos	Aprovado nas Filipinas	Epeius Biotechnologies Corp.
Oncaspar	Asparagina PEGlada	Leucemia linfoblástica aguda	Fase III/III nos EUA	Enzon. Pharmaceuticals, Inc.
Resovist	Nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas com carboxidextran	Diagnóstico de lesões no fígado e báculo	Aprovada 24/06/2006	Bayes Schering Pharma AG
Feridex	Nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas com carboxidextran	Diagnóstico de lesões no fígado e báculo	Aprovada em 2001 no mercado Europeu	Berlex Laboratories
Endorem	Nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas com carboxidextran	Diagnóstico de lesões no fígado e báculo	Aprovada por US-FDA em 1996	Guerbet

Fonte: WANG, BILLONE, MULLET, 2013

Wang, Langer e Farokhzad, em 2012, relataram seis terapias antitumorais à base de nanopartículas. A primeira terapia à base de nanopartículas aprovada para uso clínico foi a antraciclina (doxorubicina peglada) lipossomal. Northfelt et al (1998) realizaram um ensaio clínico em pacientes com sarcoma de Kaposi's associado a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), e observaram que 45,9 % dos pacientes sob uso da doxorubicina peglada obtiveram uma resposta clínica, ao passo que apenas 24,8 % dos pacientes sob uso da terapia convencional (ABV – doxorubicina, bleomicina e vincristina) responderam ao tratamento NORTHFELT et al. 1998).

Gradishar e colaboradores (2005) avaliaram, através de um estudo clínico randomizado, o efeito comparativo entre nanopartículas à base de paclitaxel-albumina e a droga padrão paclitaxel. Os seus resultados indicaram uma maior resposta da formulação nanoparticulada (33% vs 19%) e uma diminuição significativa na incidência de neutropenia (REYNOLDS et al. 2009).

Outras terapias, com base em nanoestruturas estão sob investigação pré-clínica, por exemplo: Lipoplatin, LiPlaCis e SPI-007 (formulações lipossomais da cisplatina) (MYLONAKIS et al. 2010); OncoTCS (lipossomal vincristina) (HOFHEINZ et al. 2005); NK911 (doxorubicina peglada associada a aspartato) (MATSUMARA et al. 2004); ALN-VSP e CALAA-01 (RNAs de interferências encapsulados) (OZPOLAT; SOOD; LOPEZ-BERESTEIN, 2010; DAVIS et al. 2010).

Além desses agentes antitumorais, nanopartículas metálicas, seus sais ou óxidos metálicos vêm sendo estudadas como potenciais agentes terapêuticos no combate ao câncer. Como já descrito, há vários trabalhos empregando-se nanopartículas em biomedicina, e.g. biossensores (YU & IRUDAYARAJ, 2007), liberação de fármacos/genes (TONG et al. 2007, WIJAYA et al. 2009), termoterapia (HUANG et al. 2006), entre outros; tirando proveito das propriedades ópticas e físico-químicas singulares dessas nanoestruturas.

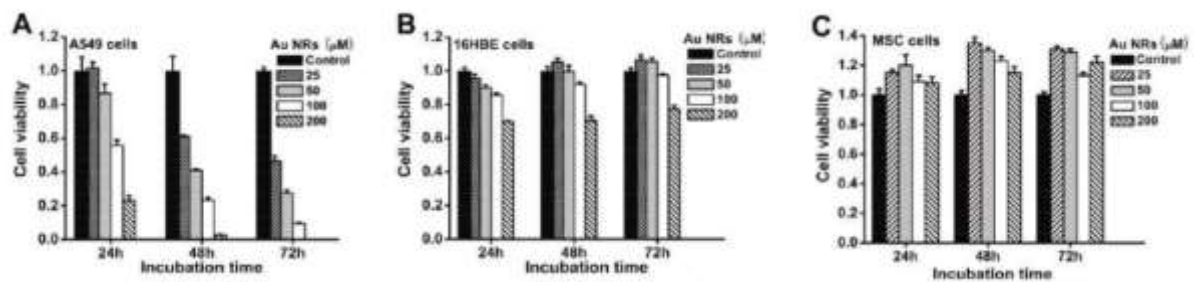
Entre esses diversos tipos de nanopartículas, nanobastões de ouro (AuNRs, *gold nanorods*) têm apresentado grande potencial no desenvolvimento de tratamentos antitumorais. Vários trabalhos já foram realizados com relação à citotoxicidade, biocompatibilidade e biodistribuição dessas partículas, tanto em relação ao seu tamanho, forma e agentes que podem ser ancorados em suas superfícies (ALBANESE et al. 2012, XU et al. 2012, GRABINSKI et al. 2011, QIU et al. 2010).

Um exemplo bastante ilustrativo, em que se toma proveito das propriedades ópticas singulares de AuNRs, é seu uso em termoterapia contra o câncer. De fato, AuNRs são capazes de absorver radiação eletromagnética na região do infravermelho próximo, transferindo parte dessa energia absorvida na forma de calor para sua vizinhança, o que pode resultar na morte de células (ALKILANY et al. 2012).

Outro estudo verificou que AuNRs, contendo em sua superfície brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr) e albumina, são capazes de causar distúrbios nas membranas lipídicas, gerando nanoaberturas que permitem um aumento da permeabilidade tanto na célula como em suas organelas, tal como lisossomos e mitocôndrias (ALBANESE et al. 2012, LEROUEIL et al 2007). Trabalhos mais recentes realizaram um estudo comparativo de absorção e transporte intracelular de AuNRs revestidos com proteína em carcinoma epitelial alveolar humano e células normais, verificando-se que essas nanoestruturas eram capazes de se acumular seletivamente em mitocôndrias de células cancerígenas, causando a morte da célula (WANG et al. 2011).

Wang e colaboradores (2011) observaram que AuNRs apresentam comportamentos diferentes quanto a absorção celular, tráfico intracelular e susceptibilidade frente aos lisossomos, em diferentes linhagens de células, gerando acúmulo maior de partículas em células cancerosas. Neste trabalho os AuNRs foram sintetizados conforme o método mediado por semente; o CTABr residual foi removido por centrifugação; e os bastões tratados com uma solução de proteína sérica bovina (BSA) a 10%. Os nanobastões de ouro assim revestidos foram expostos a três linhagens de células diferentes: células de carcinoma (A549), células epiteliais normais dos brônquios (16HBE) e células tronco adultas (MSC). A viabilidade celular foi avaliada pelo método CCK-8 (*cellcounting kit*), uma técnica similar ao MTT (Fig. 19) (WANG et al. 2011).

Figura 19 – Viabilidade de três linhagens celulares frente a AuNRs: uma cancerosa (A) A549 e duas normais (B) 16HBE e (C) MSC

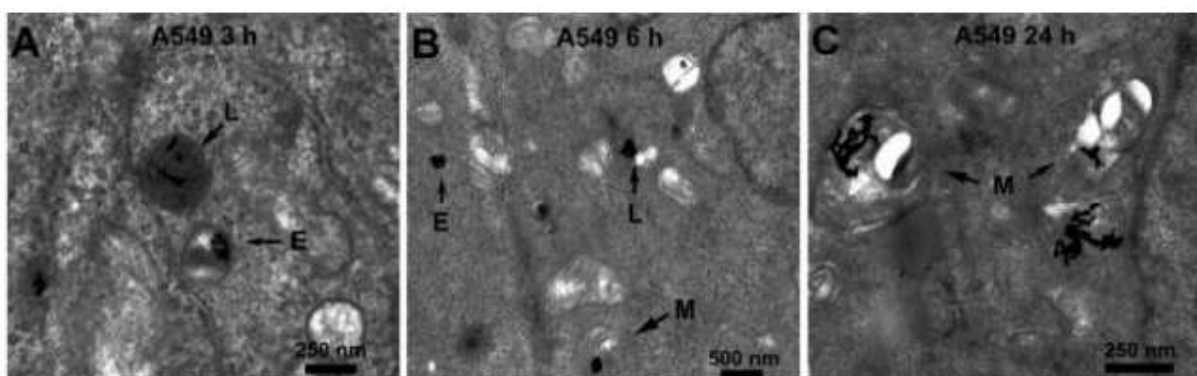


Fonte: WANG et al. 2011

Os dados obtidos neste estudo (Fig. 19), indicam que a uma concentração de 50 μM ou 100 μM de ouro na cultura, no tempo de 72 horas, os AuNRs inibiram fortemente a viabilidade das células de carcinoma A549, reduzindo a sua viabilidade para 27% e 10%, nas respectivas concentrações. Contudo, o impacto nas células normais (16HBE e MSC) foi mínimo, até mesmo na concentração máxima de estudo de 200 μM . Ademais, a citotoxicidade dos AuNRs se demonstrou dependente da concentração e do tempo de exposição. (WANG et al. 2011)

Com a finalidade de entender o modo pelo qual a citotoxicidade dos AuNRs atua seletivamente, Wang (2011) realizou caracterização por MET dos sistemas expostos. As imagens mostraram que os nanobastões se encontravam nas células, dentro de vesículas, (Fig. 20) indicando que o processo de absorção pode ter ocorrido através de alguma interação da partícula com um receptor de membrana (WANG et al. 2011).

Figura 20 – Localização intracelular de AuNRs em imagens de MET da linhagem A549 (tumoral): M = mitocôndria, L = lisossomo e E = endossomo



Fonte: WANG et al. 2011

Existem três principais modos de absorção por endocitose: pinocitose, fagocitose e endocitose mediada. Uma vez que não existe conhecimento sobre atividade de pinocitose e fagocitose em nenhuma das linhagens celulares utilizadas nesse estudo, a provável rota de absorção é endocitose mediada. Para confirmar isso, os autores submetem as amostras, sob as mesmas condições, à presença de clopromazina e sacarose (substâncias conhecidas por causar inibição do processo celular de endocitose mediada por clatrina). O resultado foi diminuição da absorção em 75 a 80%. Isso demonstrou que a rota principal de absorção dos AuNRs é a endocitose mediada por clatrina. Outros estudos similares demonstraram que o mecanismo secundário de internalização é a endocitose mediado por lipídio (WANG et al. 2011).

Os dados sugerem que os AuNRs tratados com albumina se ligam a receptores na membrana celular que ativam o processo de endocitose. O ponto de interação com o receptor é a proteína sérica que envolve os bastões. Além de reduzir a carga positiva da superfície, a proteína sérica favorece a internalização das partículas via interação proteína-receptor celular (WANG et al. 2011).

Embora os resultados obtidos nos estudos de Wang tenham dado uma perspectiva muito grande acerca da ação das nanopartículas frente ao sistemas biológicos, ainda não se explica a maior citotoxicidade dos AuNRs nas células de carcinoma. Para tentar entender isso, este mesmo grupo realizou um estudo cinético, no qual submeteu as amostras a uma série de imagens de MET em função do tempo. Os resultados indicaram a presença de AuNRs dentro da célula sob um envoltório lipídico (endossoma/lisossomo). Contudo, na linhagem celular A549 havia a presença de AuNRs livres no citoplasma e em grande concentração na mitocôndria (WANG et al. 2011).

A ideia proposta para explicar esta seletividade, leva em consideração um aspecto muito importante do metabolismo celular: os lisossomos apresentam enzimas capazes de desnaturar proteínas. A desnaturação da proteína sérica que envolve o AuNR, causa a exposição das moléculas de CTABr. O CTABr exposto pode destruir a membrana lisossomal, se difundir no citoplasma e, através de sua característica catiônica pode direcionar essas partículas para a mitocôndria (potencial transmembranar negativo) e causar o efeito citotóxico esperado (interrupção da produção de ATP, estresse oxidativo, morte celular) (WANG et al. 2011).

As células de carcinoma A549 são menos tolerantes ao CTABr. Devido ao intenso metabolismo de multiplicação celular, a estrutura da membrana lisossomal dessas células é mais frágil e, dessa forma, pode ser rompida frente a ação do CTABr exposto. As células MSC e 16HBE, todavia não apresentaram ruptura lisossomal. Dessa forma, a ação tóxica dos AuNRs é seletiva devido a característica intrínseca da célula de carcinoma (WANG et al. 2011).

Este trabalho mostra resultados muito promissores, contudo poucos estudos têm sido reportados com relação ao mecanismo de inibição seletiva dessas nanopartículas na mitocôndria de células cancerígenas.

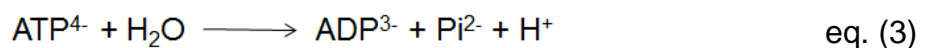
**4 METABOLISMO E BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL**

4 METABOLISMO E BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

Metabolismo é o termo utilizado para designar o conjunto de transformações químicas que ocorrem em uma célula ou em um organismo vivo. Nelson e Cox (2014) descrevem as quatro principais funções do metabolismo: i) obtenção de energia química; ii) conversão de nutrientes em precursores de macromoléculas; iii) polimerização de precursores monoméricos; e iv) síntese e degradação de biomoléculas necessárias para funções celulares específicas.

Didaticamente, o metabolismo pode ser dividido em duas fases: catabolismo e anabolismo. A fase de catabolismo envolve reações de degradação de moléculas nutrientes em produtos menores (ácido láctico e CO₂) liberando energia que pode ser conservada na forma de uma ligação de fosfato presente no ATP (trifosfato de adenosina) (NELSON; COX, 2014). No anabolismo, precursores simples são transformados em moléculas maiores e complexas (lipídeos, polissacarídeos, proteínas). As reações nesta última fase necessitam de energia para ocorrer. Essa energia é obtida através da transferência do grupo fosforil do ATP ou do poder redutor das coenzimas NADH, NADPH e FADH₂ produzidos na fase catabólica (MALTIN, 2016).

As células heterotróficas utilizam a energia proveniente do catabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas para sintetizar de ATP a partir de ADP (difosfato de adenosina) e Pi (fosfato inorgânico). O ATP produzido é capaz de doar parte de sua energia química, via hidrólise, para processos endergônicos ($\Delta G > 0$). A variação da energia livre sob condições-padrão (ΔG°) para a hidrólise de ATP é $-30,5$ kJ/mol (NICHOLLS; FERGUSON, 2013).



4.1 METABOLISMO HEPÁTICO

O fígado é o maior órgão do corpo, contribuindo com cerca de 2% do peso corporal total (HALL, 2011). Localizado no cruzamento entre o trato digestório e o restante do corpo, este órgão é considerado a principal ferramenta de biotransformação dos compostos químicos endógenos e exógenos (xenobióticos), essa grande glândula

anexa apresenta altos níveis de enzimas metabolizadoras (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Os fármacos administrados por via oral são absorvidos no intestino e entram na circulação porta para sua primeira passagem pelo fígado, onde sofrem ação das enzimas metabolizadoras. Estas enzimas são agrupadas em duas fases de acordo com as reações que elas promovem: i) reações de fase I, que possibilitam a introdução dos grupos funcionais -OH, -COOH, -SH, -O- ou NH₂ através de reações de oxidação, redução ou hidrólise (enzimas do citocromo P450, monoxigenases contendo flavina e epóxido hidrolases) ou; ii) reações de fase II, pelas quais as enzimas (sulfotransferases, UDP-glicuronosiltransferases, N-acetil transferases, metiltransferases) catalisam a conjugação de um substrato, tornando o metabólito mais hidrossolúvel facilitando a sua eliminação. Embora uma parte do fármaco escape do metabolismo de primeira passagem, as passagens subsequentes pelo fígado resultam em mais metabolismo até que o fármaco tenha sido totalmente eliminado (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007). O fato do fígado ser o primeiro contato da droga antes de atingir a circulação sanguínea, faz com que este órgão seja muito utilizado em estudos de toxicidade.

O fígado exerce o crítico trabalho de manter a homeostasia metabólica do corpo. Isso inclui a armazenagem do sangue, de vitaminas e ferro, formação de fatores de coagulação, síntese de muitas proteínas plasmáticas e a detoxicação e excreção para a bile de produtos de eliminação endógenos e xenobióticos. Este órgão é responsável também pelo processamento de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e vitaminas da dieta (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; HALL, 2011).

4.2 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Carboidratos são polioidroxialdeídos ou polioidroxicetonas, ou substâncias que geram estes compostos quando hidrolisadas. Esta biomolécula é o principal elemento da dieta heterotrófica e a sua oxidação é a via central de produção de energia na maior parte das células. A maioria dos carboidratos é encontrada na natureza na forma de polissacarídeos, como o amido e o glicogênio (NELSON; COX, 2014). A digestão destes polímeros inicia na boca e se estende até o intestino, onde sofrem ação de enzimas hidrolíticas, e.g. na superfície dos enterócitos (epitélio intestinal), e são convertidos a monossacarídeos (glicose, frutose e galactose). Os monômeros são

absorvidos nos enterócitos por transportadores específicos (SGLT1 e GLUT5) e carregados pela corrente sanguínea para todos os tecidos do corpo (MOYES; SCHULTE, 2010).

Nos animais, a glicose absorvida possui três destinos principais: i) síntese de polissacarídeos complexos, direcionados ao espaço extracelular; ii) armazenamento em células; ou iii) ser oxidada a compostos de três carbonos por meio da glicólise. A glicólise é a via metabólica pela qual uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato, com a liberação de energia conservada na forma de ATP e NADH. Outros monossacarídeos (frutose e galactose) também podem entrar na via glicolítica (NELSON; COX, 2014).

A via glicolítica, detalhada por Otto Meyerhof em 1940, compreende 10 reações enzimáticas, das quais três são irreversíveis. A primeira é catalisada pela hexoquinase, que fosforila a glicose para produzir glicose-6-fosfato. A segunda reação é catalisada pela fosfofrutoquinase I e a terceira pela piruvato quinase. A fosfofrutoquinase converte a frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato, ao passo que a piruvato quinase converte fosfoenolpiruvato em piruvato (HAY, 2016). O piruvato formado na glicólise sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo da piruvato-desidrogenase. Nesta reação, o grupamento carboxil do piruvato é removido na forma de CO_2 , e os carbonos remanescentes são convertidos ao grupo acetil da acetil-CoA com a liberação de uma molécula de NADH.

4.3 METABOLISMO DE LIPÍDEOS

Os lipídeos constituem um grupo de compostos quimicamente diversos insolúveis em água. Os triacilgliceróis são os lipídeos mais simples, compostos por três ácidos graxos, cada um em ligação éster com uma mesma molécula de glicerol (CAMPBELL, 2013).

Os triacilgliceróis insolúveis consumidos na dieta são convertidos, pela ação dos sais biliares, à micelas microscópicas para que possam ser absorvidos. A formação destas micelas facilita a ação de lipases hidrossolúveis presentes no intestino que transformam os triacilgliceróis em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (NELSON; COX, 2014).

Os produtos da ação da lipase são absorvidos pela mucosa intestinal, sendo novamente convertidos a triacilgliceróis e empacotados com colesterol e proteínas

específicas, gerando agregados de lipoproteínas, os quilomícrons. Assim, os triacilgliceróis são transportados nas lipoproteínas e carregados pelo sangue para os músculos e tecido adiposo, onde são hidrolisados a ácido graxo e glicerol. No músculo, os ácidos graxos são oxidados para a obtenção de energia, já no tecido adiposo, eles são reconvertidos a triacilgliceróis e armazenados (NELSON; COX, 2014; CAMPBELL, 2013).

A obtenção de energia a partir de lipídeos ocorre através da β -oxidação, um processo de quatro etapas por meio do qual os ácidos graxos são convertidos a acetil-CoA com a produção de coenzimas reduzidas ($FADH_2$ e $NADH$). A β -oxidação pode ocorrer em todas as células do corpo, todavia acontece com especial rapidez nas células hepáticas (HALL, 2011).

4.4 METABOLISMO DE PROTEÍNAS

Proteínas são polímeros de aminoácidos unidos através de uma ligação peptídica. As proteínas ingeridas na dieta são enzimaticamente degradadas a seus respectivos monômeros de aminoácidos. No estômago, as proteínas sofrem desnaturação decorrente da acidez do suco gástrico, que torna suas ligações peptídicas mais suscetíveis à hidrólise pela ação da enzima pepsina. No intestino delgado, os peptídeos menores produzidos pela pepsina, são hidrolisados por duas enzimas de origem pancreática, a tripsina e a quimiotripsina. A degradação de pequenos peptídeos no intestino é então completada por outras peptidases intestinais (carboxipeptidases A e B) (LOURENÇO, 2000).

Os aminoácidos livres são transportados para dentro das células epiteliais, chegam aos capilares onde são conduzidos para o fígado. A maior parte dos aminoácidos é metabolizada no fígado e podem servir de precursores para a síntese de novas proteínas, de glicose (via gliconeogênese), ácidos graxos ou para produção de ATP (NELSON; COX, 2014).

Assim, como as demais biomoléculas, os aminoácidos também podem ser degradados para a produção de energia metabólica. A primeira etapa do catabolismo dos aminoácidos é a transferência do grupo amino para o α -cetoglutarato, formando glutamato. O glutamato é então transportado para a mitocôndria onde sofre ação da glutamato-desidrogenase. A amônia produzida nesta reação é utilizada, juntamente

com o CO₂, produzido na respiração mitocondrial, para formar carbamóil-fosfato que, por fim, entra no ciclo da ureia (KREBS; BELLAMY, 1960).

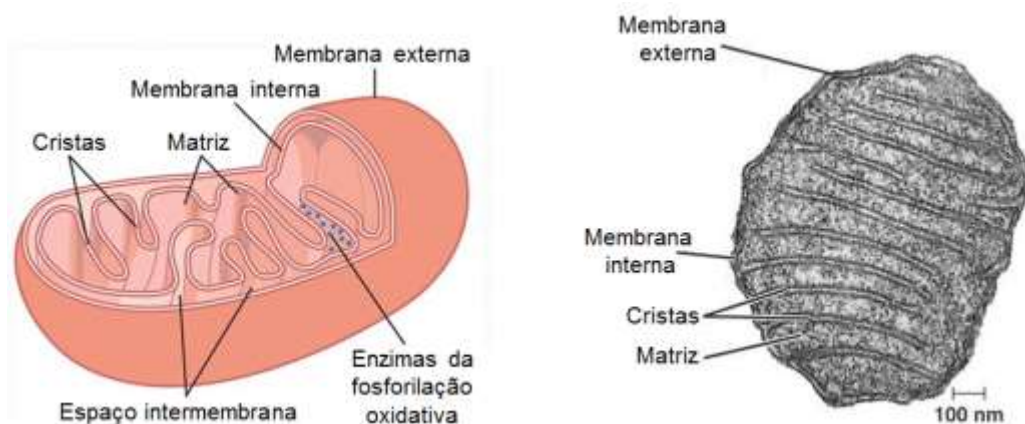
Após a remoção do grupamento amino, os esqueletos carbônicos dos vinte aminoácidos são oxidados para formar seis compostos principais que participam, direto ou indiretamente, do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) na mitocôndria: acetil-CoA, α-cetoglutarato, acetoacetil-CoA (indiretamente), piruvato (indiretamente), fumarato e succinil-CoA (CAMPBELL, 2013).

4.5 MITOCÔNDRIAS

A maior parte da energia na forma de ATP é produzida na mitocôndria. Com o diâmetro médio de 1 μm, essa organela está distribuída por todo o citoplasma, concentrando-se mais nas porções da célula que utilizam a maior parte de seu metabolismo energético. O número total de mitocôndrias por células varia de menos de cem até vários milhares (HALL, 2011).

A estrutura básica da mitocôndria (Fig. 21) é composta principalmente por duas membranas: externa e interna. A membrana mitocondrial externa é permeável a moléculas pequenas e a íons. A membrana interna, no entanto, é impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons. A única forma de atravessar a membrana interna é através do uso de transportadores específicos (CAMPBELL, 2013; NELSON; COX, 2014).

Figura 21 – Mitocôndria e sua estrutura: (A) desenho esquemático e (B) micrografia de MET



Fonte: HALL, 2011; VOET et al. 2014

O interstício delimitado pela membrana interna é chamado de matriz mitocondrial, onde estão concentradas grandes quantidades das enzimas responsáveis pelo metabolismo energético (piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas da β -oxidação e da oxidação dos aminoácidos). É na matriz que estão localizadas todas as vias de oxidação dos nutrientes, exceto a glicólise (NELSON; COX, 2014; ALBERTS et al. 2010).

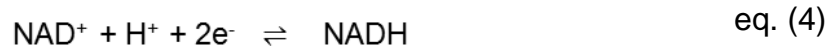
4.6 RESPIRAÇÃO CELULAR

A oxidação de carboidratos, lipídeos e alguns aminoácidos convergem para a formação de acetil-CoA, material de partida para o ciclo do ácido cítrico. Os esqueletos carbônicos de outros aminoácidos podem ser convertidos a outros intermediários do ciclo. Assim que o acetil-CoA entra no ciclo, este sofre ação da primeira enzima do ciclo, a citrato-sintase, que é capaz de promover a sua condensação com o oxaloacetato para formação de citrato (NELSON; COX, 2014).

Em sete etapas sequenciais, o ciclo do ácido cítrico converte citrato a oxaloacetato promovendo a liberação de energia na forma de três moléculas de NADH, uma molécula de $FADH_2$ e um ATP. Trata de uma via cíclica, onde os intermediários estão sendo consumidos e produzidos novamente (NELSON; COX, 2014).

Durante o catabolismo das biomoléculas, algumas coenzimas são capazes de captar elétrons liberados nas reações de oxidação: nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou $NADP^+$) e nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD). Essas coenzimas, também conhecidas como aceptores universais de elétrons, fornecem os elétrons necessários para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, em um processo que gera a maior parte do ATP produzido na célula (CAMPBELL, 2013).

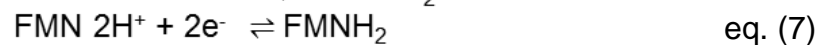
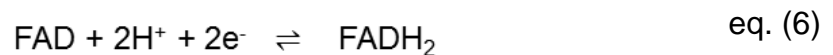
As formas reduzidas NADH e NADPH são carreadoras de elétrons que se associam a uma classe de enzimas desidrogenases ligadas a nucleotídeos de nicotinamida. Essas enzimas catalisam reações reversíveis de oxirredução desses compostos, conforme as equações (NICHOLLS; FERGUSON, 2013):



O NADPH usualmente é direcionado para suprir os elétrons das reações de anabolismo. O NADH, no entanto, é conduzido à cadeia transportadora de elétrons onde sofre ação do primeiro complexo enzimático: NADH-desidrogenase mitocondrial ou complexo I.

A membrana interna é impermeável a NADH, dessa forma, os elétrons conservados nas moléculas de NADH citosólicas são transferidos para seu equivalente redutor mitocondrial através de um sistema de lançadeiras (CAMPBELL, 2013).

Os nucleotídeos de flavina (FAD e FMN) possuem um potencial de redução maior que os nucleotídeos de nicotinamida, além de serem capazes de aceitar dois ou apenas um elétron, neste último caso produzindo a forma semiquinona.



Outros três tipos de moléculas carreadoras de elétrons estão organizadas em complexos supramoleculares na membrana interna mitocondrial e compõem a cadeia transportadora de elétrons: ubiquinona e duas classes de proteínas que contêm ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre). A ubiquinona (Q) é um carreador hidrofóbico capaz de se difundir livremente na bicamada lipídica e pode aceitar um (*QH) ou dois elétrons (QH₂), assim como os nucleotídeos de flavina (NELSON; COX, 2014).

Os citocromos são proteínas que possuem o grupo heme coordenado ao ferro. As mitocôndrias apresentam os tipos de citocromos a, b e c. Os citocromos das classes a, b e alguns da classe c são proteínas integrais de membrana. Contudo o citocromo c mitocondrial é uma proteína solúvel situada no espaço intermembrana. As proteínas ferro-enxofre, por outro lado, são compostas por centros de ferro coordenados a átomos de enxofres presentes em resíduos de cisteína e participam da transferência de um elétron, onde o átomo de ferro é reduzido ou oxidado (NELSON; COX, 2014).

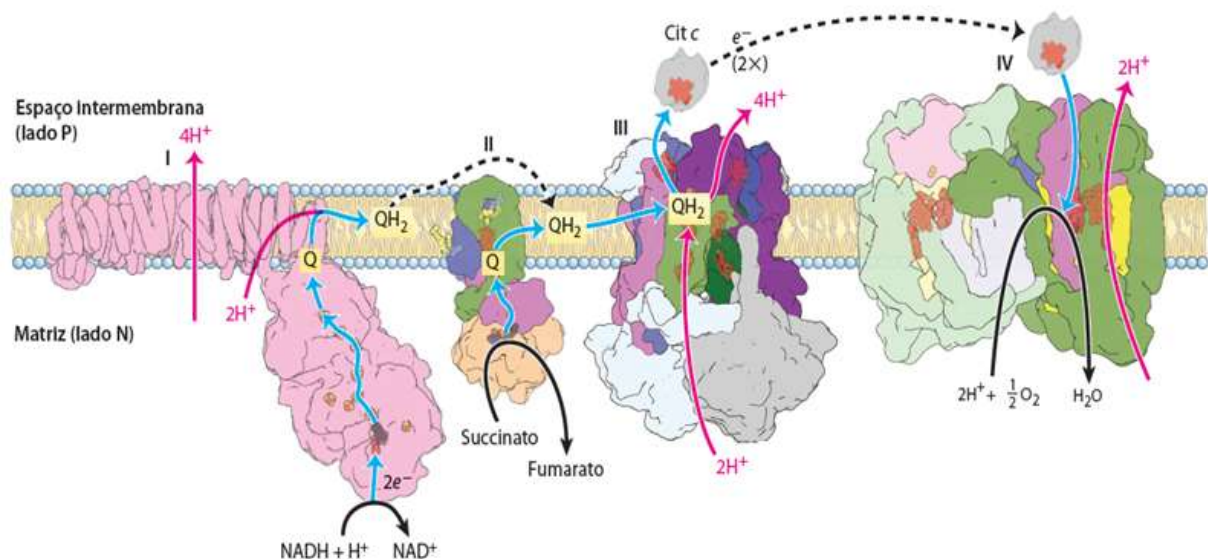
Os citocromos e as proteínas ferro-enxofre estão organizadas em quatro complexos enzimáticos (Fig. 22):

- Complexo I – também conhecido como NADH-desidrogenase, é uma enzima grande que possui seis centros ferro-enxofre e uma flavoproteína (FMN). Este complexo enzimático é capaz de transferir o elétron presente no NADH para a

ubiquinona, usando a energia proveniente desta transferência para bombear 4 prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana.

- Complexo II – também conhecido como succinato-desidrogenase, é uma enzima que faz parte do ciclo do ácido cítrico e catalisa a transferência de elétrons do succinato (oxidado a fumarato) para o FAD e, posteriormente, para ubiquinona.
- Complexo III – também chamado de complexo do citocromo bc_1 , é capaz de acoplar a transferência de elétrons do ubiquinol (forma reduzida da ubiquinona) para o citocromo c, promovendo o transporte de mais quatro prótons da matriz para o espaço intermembrana.
- Complexo IV – ou citocromo oxidase, é o último complexo enzimático carreador de elétrons da cadeia transportadora de elétrons. Sua principal função é a transferência dos elétrons presentes no citocromo c para o oxigênio, reduzindo-o a água. Através da atividade do complexo IV, dois prótons são bombeados.

Figura 22 – O fluxo de elétrons e os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons



Fonte: NELSON; COX, 2014

O contínuo bombeamento de prótons pelos multicomplexos enzimáticos da cadeia respiratória gera um gradiente de concentração de prótons, sendo o espaço intermembrana com maior concentração dessa espécie. Segundo o modelo quimiosmótico, proposto por Peter Mitchell (1961), o potencial eletroquímico gerado

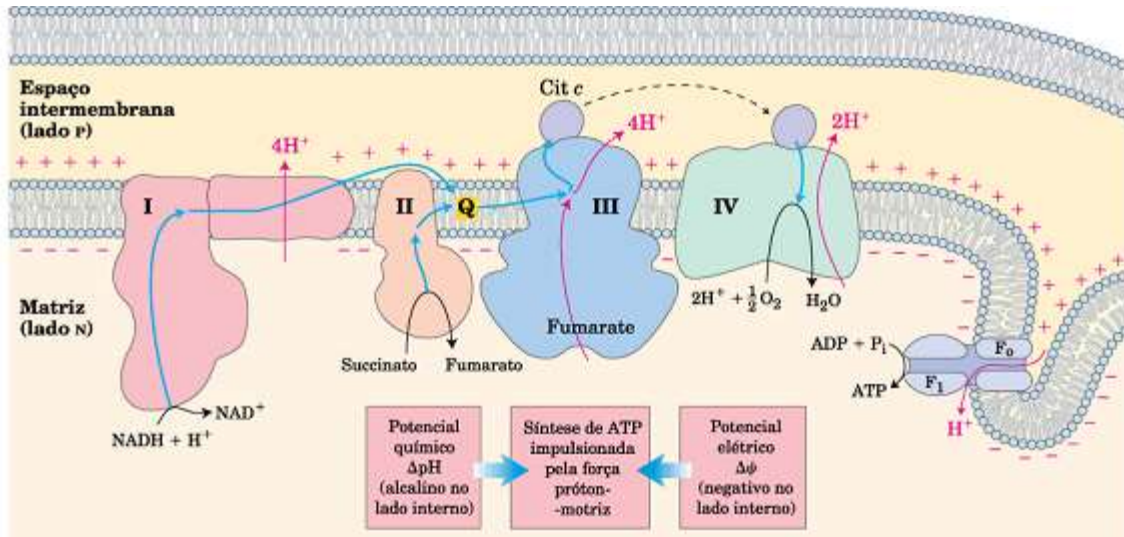
pela diferença de concentração de prótons produz uma força próton-motriz capaz de promover a síntese de ATP (MURRAY et al. 2014; NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

O potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) possui duas componentes: uma química (ΔpH), decorrente da maior concentração de prótons no espaço intermembrana e; uma elétrica ($\Delta\Psi$), decorrente da diferença de potencial elétrico nos dois ambientes aquosos (espaço intermembrana e matriz). A componente elétrica, em condições fisiológicas, é dominante, pois a química varia pouco, apenas 0,5 unidades de pH (NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

A teoria quimiosmótica explica a dependência da transferência de elétrons (oxidação) e a síntese de ATP (fosforilação). A força próton-motriz, gerada pelo gradiente de próton, impulsiona os prótons de volta à matriz através de um outro complexo enzimático, a ATP-sintase (JUNGE; NELSON, 2015) (Fig. 23). A ATP-sintase é composta por dois elementos: F_0 , uma proteína integral de membrana que possui um poro para prótons, por onde os prótons bombeados na cadeia respiratória tornam a matriz; e F_1 , uma proteína periférica que possui sítios ativos de fosforilação do ADP (NELSON; COX, 2014).

O mecanismo de produção de ATP pela ATP-sintase é explicado através de um fenômeno conhecido como catálise rotacional. O subcomplexo F_0 é formado por um cilindro de subunidades protéicas c (c_{10}), ligado a uma subunidade γ com a forma de uma haste inclinada. Esta haste se encaixa na parte central do subcomplexo F_1 , formado por três subunidades proteicas α e três β , estas últimas possuem os sítios ativos de fosforilação. A subunidade β do primeiro sítio (β -ADP) está associada ao ADP e ao P_i , uma outra subunidade β estabiliza o ATP (β -ATP) e a última subunidade assume a conformação β -vazio (NICHOLLS; FERGUSON, 2013). A passagem de próton através da porção F_0 da ATP-sintase promove uma mudança conformacional nos três sítios ativos de F_1 . A corrente de prótons através do F_0 faz com a subunidade γ rotacione, provocando a compressão das subunidades β , que alternam suas conformações proporcionando a síntese de ATP (JUNGE; NELSON, 2015; MURRAY et al. 2006).

Figura 23 – Teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria. Fluxo de elétrons acompanhado do bombeamento de prótons e estabelecimento do potencial eletroquímico acoplado a síntese de ATP



Fonte: NELSON; COX, 2014

Cada ciclo promovido pela catálise rotacional gera três moléculas de ATP. Os prótons transportados para a matriz pela ATP-sintase são bombeados de volta para o espaço intermembrana em um ciclo contínuo, mantendo o acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase (MURRAY et al. 2014).

4.7 ESTADOS DO CONTROLE RESPIRATÓRIO

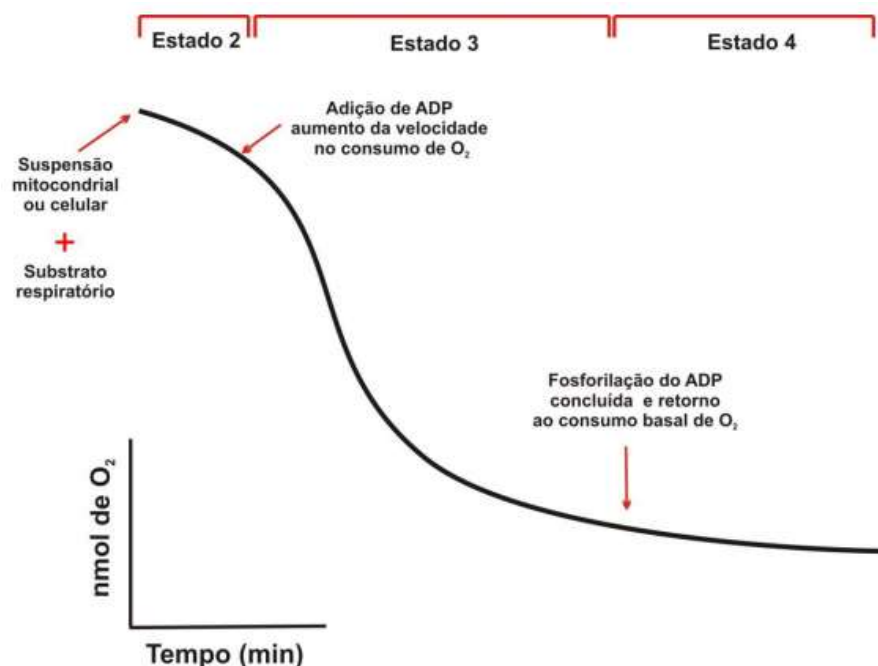
A cinética da fosforilação oxidativa em preparações mitocondriais foi esclarecida em 1955 por Chance e Williams. Neste estudo, os autores demonstraram que o consumo de oxigênio aumentava à medida que substratos e ADP eram adicionados ao homogenato de mitocôndrias, possibilitando a elucidação de diferentes estados da fosforilação oxidativa (Fig. 24) (CHANCE; WILLIAMS, 1955; MEISTER, 2009):

- Estado 1 – caracterizado pela presença de mitocôndrias;
- Estado 2 – adição do substrato para cadeia transportadora de elétrons (precursores de NADH, como os intermediários do ciclo do ácido cítrico; ou succinato);
- Estado 3 – ou estado fosforilativo ou velocidade de fosforilação (V_3), caracterizado pelo início da fosforilação decorrente da adição de ADP. O ADP é capaz de ativar a ATP-sintase, promovendo a entrada de prótons que, na

matriz, atuam como feedback positivo intensificando a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, assim, aumentando o consumo de oxigênio;

- Estado 4 – ou estado de repouso ou velocidade de repouso (V_4), caracterizado pelo esgotamento do ADP. Neste estado, o consumo de oxigênio diminui drasticamente atingindo um platô. O estado de repouso também pode ser induzido pela adição de inibidores específicos da ATP-sintase;
- Estado 5 – caracterizado pela ausência de oxigênio.

Figura 24 – Estados da respiração



Fonte: MAIOLI, 2012

4.8 INIBIDORES E DESACOPLADORES MITOCONDRIAIS

Inibidores e desacopladores foram amplamente utilizados tanto para a determinação da sequência de carreadores de elétrons da cadeia respiratória, quanto no esclarecimento do mecanismo de acoplamento existente entre a oxidação (cadeia transportadora de elétrons) e a fosforilação (ATP-sintase). Ainda hoje, essas substâncias são utilizadas para determinação do mecanismo de ação de muitas drogas que atuam em algum desses dois processos (REIS, 2014; MAIOLI, 2012).

A rotenona (inseticida) e o amobarbital (barbitúrico), por exemplo, inibem a NADH-desidrogenase bloqueando a transferência de elétrons entre o centro de ferro-enxofre e a ubiquinona. A antimicina A e o dimercaprol são capazes de inibir o

complexo III da cadeia respiratória entre os citocromos b e c. O ácido sulfídrico (H_2S), monóxido de carbono (CO) e o cianeto (CN^-) inibem a citocromo oxidase (complexo IV). Por outro lado, a oligomicina é um antibiótico capaz de bloquear a ATP-sintase (MURRAY et al. 2014).

Os desacopladores, como o nome sugere, promovem a dissociação entre a oxidação da cadeia respiratória e a fosforilação. O 2,4-dinitrofenol e o CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona) têm sido utilizados com maior frequência. Estes desacopladores são anfipáticos e aumentam a permeabilidade da membrana interna a prótons, reduzindo o potencial eletroquímico e fazendo com que a oxidação ocorra independente da ATP-sintase (MURRAY et al. 2014).

O desacoplamento entre a cadeia respiratória e a síntese de ATP também ocorre em condições fisiológicas, devido a ação da proteína desacopladora UCP. A UCP é uma proteína da membrana mitocondrial interna, presente em grandes quantidades no tecido adiposo marrom de mamíferos, que atua como um canal de próton, utilizando a energia proveniente da força próton-motriz para a produção de calor. Esse fenômeno é fundamental na produção de calor em recém-nascidos, no desenvolvimento do estado febril e na hibernação dos mamíferos (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

4.9 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

As sucessivas reações de oxirredução da cadeia transportadora de elétrons nos complexos multienzimáticos culminam na redução do O_2 , formando H_2O . O oxigênio molecular apresenta elétrons desemparelhados no estado fundamental, por isso tende a receber um elétron por vez. Dessa forma a redução incompleta do oxigênio molecular pode gerar radicais livres reativos que causam danos na célula (AUGUSTO, 2006).

A transferência dos elétrons do ubiquinol para o complexo III, assim como a passagem de elétrons do complexo II para a ubiquinona (Q), envolve a formação do intermediário $^*\text{Q}$ que, em uma condição extraordinária, pode doar um elétron ao O_2 , promovendo a formação do radical ânion superóxido (NELSON; COX, 2014).

A parcela de oxigênio que é reduzida a superóxido na respiração mitocondrial tem sido estimada entre 0,1 a 1% do total de oxigênio consumido. Este achado reforça

a necessidade de um sistema antioxidante suficiente para proteger os organismos aeróbios do dano ocasionado pelos radicais livre (AUGUSTO, 2006)

A formação do radical livre superóxido (O_2^-) pode conduzir à produção de radical hidroxila (OH^\cdot), ainda mais reativo, via reação de Fenton. Com a finalidade de impedir os danos oxidativos (estresse oxidativo), causados por estes radicais, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente capaz de inativá-los, composto pela superóxido dismutase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glutaciona, NAD(P) transhidrogenase, NADPH, vitaminas E e C, e a própria respiração. (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999). A enzima superóxido dismutase presente na matriz mitocondrial, por exemplo, catalisa a conversão do O_2^- a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma segunda enzima (glutaciona-peroxidase) converte H_2O_2 em H_2O , inofensivo para a célula (NELSON; COX, 2014).

Recentemente muitos estudos tem investigado a nicotinamida nucleotídeo transhidrogenase (NNT) (LESKOV et al. 2016; DEY et al. 2016). A NNT é uma proteína transmembranar presente na membrana interna da mitocôndria que é capaz de acoplar a oxidação do NADH à redução do $NADP^+$ promovendo nesta reação a entrada de prótons a favor do gradiente (DEY et al. 2016).

A associação entre o excesso de Ca^{2+} e o estresse oxidativo mitocondrial tem sido amplamente estudada (STARKOV; POSTER; FISKUM, 2002; BROOKES et al. 2004; BYRNE et al. 1999). O acúmulo deste cátion aumenta a produção de EROS através de diversos mecanismos, incluindo um acréscimo na atividade do ciclo do ácido cítrico e formação de NADH, ativação de enzimas capazes de produzir EROS como a glicerol fosfato e α -cetoglutarato desidrogenase e elevação na produção de NO^\cdot e consequente inibição respiratória (KOWALTOWSKI et al. 2009).

4.10 TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna com a liberação de moléculas de até 1,5kD. Esse processo pode levar à morte celular através da necrose e da apoptose através da liberação moléculas sinalizadoras (SKULACHEV, 1998). A TPM é uma condição de permeabilização tipicamente induzida por acúmulo de íons Ca^{2+} e condições de estresse oxidativo. Esta permeabilização da membrana mitocondrial interna prejudica sua funcionalidade, causando inchamento da organela, perda de potencial de

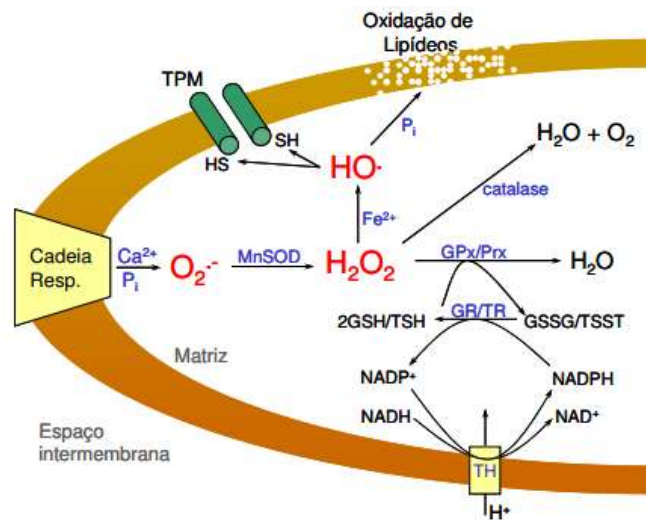
membrana e perda da capacidade de transportar cálcio, causando consequente, a ruptura da membrana interna e externa (SKULACHEV 1998, KOWALTOWSKI & VERCESI 1999).

Acredita-se que a TPM seja causada pela modificação de componentes da matriz e da membrana interna, e, possivelmente, da membrana externa, que incluem além da ciclofilina D, o translocador ADP/ATP (ANT), e VDAC, dentre outras proteínas (BRDICZKA et al. 1998). Vercesi e colaboradores (1999) demonstrou, em vários estudos, que o acúmulo de Ca^{2+} na mitocôndria e estresse oxidativo são indutores de TPM (FIGUEIRA et al. 2013, KOWALTOWSKI et al. 2009).

Os primeiros experimentos mostrando a perda da capacidade mitocondrial de reter Ca^{2+} mostraram que esse processo era estimulado pela oxidação dos nucleotídeos de piridina das mitocôndrias e inibido, ou revertido, pela redução do NAD(P)^+ (LEHNINGER et al. 1978). Além disso, a oxidação do NADPH mostrou estar mais relacionada à TPM do que a oxidação do NADH (VERCESI, 1987). Dados posteriores confirmaram que o estado reduzido do NAD(P)^+ , modulado pelo uso de oxidantes e redutores, regulava o início da TPM (KOWALTOWSKI et al 2001). Esses achados foram as primeiras indicações de que a TPM estava relacionada ao estado redox das mitocôndrias e que podia ser desencadeada por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Fig. 25), uma vez que o NADPH representa a principal fonte de poder redutor para defesa da mitocôndria contra o estresse oxidativo.

O NADPH é usado para reconstituir os substratos glutationa (GSH) e tiorredoxina (TSH), que mantém a funcionalidade das principais enzimas removedoras de H_2O_2 nas mitocôndrias, a glutationa peroxidase (GPx) e tiorredoxina peroxidase (TPx) mitocondrial, respectivamente (KOWALTOWSKI et al. 2001). Uma vez que o estado redox do NAD(P)H está intimamente associado ao estado redox da glutationa e de grupos tióis da mitocôndria, ficou evidente que a TPM está relacionada com o estado redox dos grupos tióis das mitocôndrias.

Figura 25 – Esquema do mecanismo de abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial dependente de Ca^{2+} e P_i



Fonte: KOWALTOWSKI et al. 1996

Sabemos que a TPM ocorre quando grupos tióis das proteínas da membrana interna da mitocôndria estão oxidados, resultando em mudanças conformacionais e agregação/polimerização de proteínas formando poros não seletivos. A ligação cruzada entre grupamentos tióis parece ser essencial para este processo, uma vez que reagentes promotores de ditióis induzem a TPM. De fato, a ligação cruzada de proteínas da membrana interna pode ser observada após indução de TPM em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (FAGIAN et al. 1990, VALLE et al. 1993, Bernardes et al 1994).

Segundo Hunter, Haworth e Southard (1979), a TPM mitocondrial ocorre devido a abertura reversível de um poro proteico na membrana interna, o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM). A oxidação dos resíduos $-\text{SH}$ do aminoácido de cisteína do PTPM e a consequente formação de ligações dissulfeto (S-S) é capaz de provocar a abertura deste poro (FAGIAN et al. 1990).

A permeabilização gerada pela abertura do PTPM pode ser inibida pela ciclosporina A, um clássico inibidor capaz de se ligar a ciclofilina D, componente do PTPM, impedindo a sua abertura. A abertura do PTPM pode ser estimulada por compostos capazes de aumentar o estresse oxidativo tais como Ca^{2+} , fosfato inorgânico (P_i) e oxidantes de grupamentos tióis (KOWALTOWSKI et al. 1999).

O estresse oxidativo também causa danos oxidativos em componentes não-proteicos da mitocôndria. A oxidação lipídica pode aumentar os efeitos lesivos da TPM

na célula, pois também desencadeia o inchamento mitocondrial, a liberação de citocromo c e impede a fosforilação oxidativa (KOWALTOWSKI et al. 1996). Na verdade, a impossibilidade de se reverter a oxidação lipídica faz essa forma de dano mitocondrial ser potencialmente mais danosa que a TPM, visto que essa última pode ser reversível logo após seu início (FAGIAN et al. 1990).

4.11 MITOCÔNDRIA E MORTE CELULAR

Quando uma célula é submetida a insultos severos que promovem a disfunção dos componentes celulares essenciais, ela pode sofrer uma morte acidental, também conhecida como necrose. Por outro lado, a maioria das células possuem um mecanismo que permite a sua morte programada ou apoptose. Este último processo é essencial para a manutenção da vida em organismos multicelulares, pois através dele, células defeituosas ou em desuso podem ser eliminadas (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999). Em células vertebradas, a apoptose pode ocorrer através de duas vias que convergem na ativação da cascata de sinalização das caspases (caspase 3 e 7) (TAIT; GREEN, 2010; DONG et al. 2016).

Na via extrínseca, a ligação no receptor específico de morte celular provoca o recrutamento de moléculas conhecidas como “domínios adaptadores de morte” ou FADDs, que se ligam e ativam um iniciador de caspase, a caspase 8. A ativação da caspase 8 promove a clivagem e ativação das caspases efetoras 3 e 7 (TAIT; GREEN, 2010).

Através da via intrínseca, danos no DNA celular ou estresse oxidativo induzem o aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, levando a liberação de proteínas proapoptóticas. O citocromo c, presentes no espaço intermembranar, é liberado e se liga ao fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF-1), induzindo a sua auto-oligomerização e formação do complexo apoptossomo. Em seguida, o apoptossomo ativa a caspase 9, que, por sua vez, cliva e ativa as caspases 3 e 7. A liberação do segundo ativador mitocondrial de caspases (SMAC ou DIABLO) e da protease OMI bloqueia a ação do inibidor de apoptose ligado ao X resultando na degradação do DNA, proteínas do citoesqueleto e morte celular (TAIT; GREEN, 2010).

Diversas situações variadas que levam ao dano mitocondrial, e, conseqüentemente, a alteração da permeabilização de suas membranas, podem levar a morte celular pela via intrínseca ou mitocondrial. Este processo pode estar envolvido

na patogênese de diversas doenças, bem como, sua ativação pode ser terapêutica no caso de inibição do crescimento de tumores. Diversas drogas usadas no tratamento de câncer estimulam a apoptose agindo diretamente ou indiretamente na permeabilização da membrana mitocondrial (CULLEN et al. 2007, NGUYEN & HUSSAIN 2007). Contudo a mitocôndria também pode liberar fatores apoptogênicos em função da permeabilização da membrana mitocondrial interna via TPM (LEMASTERS et al. 1998, CROMPTON 1999; VYAS et al. 2016).

4.12 MITOCÔNDRIA E O CÂNCER

Em 1925, Otto Warburg tentando correlacionar a deficiência de oxigênio com a origem do câncer, observou a taxa de respiração de secções do tecido de um carcinoma seminal, e comparou com tecidos normais (rim e fígado). Como esperado, a respiração do tecido tumoral foi menor do que nos tecidos normais. Esta foi a primeira evidência de que células tumorais exibiam “glicólise sob condições aeróbicas”.

Essa descoberta, mais tarde foi interpretada como um defeito na fosforilação oxidativa mitocondrial. Weinhouse e colaboradores apoiavam a ideia de que células tumorais não eram capazes de oxidar glicose. Contudo, este mesmo grupo realizou um experimento que demonstrou que a glicose pode ser oxidada a CO₂, ou seja, a fosforilação oxidativa em células tumorais pode ocorrer a uma velocidade similar a células normais (WARBURG, 1956).

Atualmente, já se sabe que as células tumorais apresentam um estado metabólico inalterado com o aumento do metabolismo glicolítico e o contínuo uso de oxigênio. Hay (2016) afirma que durante o crescimento tumoral, as células mais internas ao tumor entram em uma condição de hipóxia (baixa concentração de O₂) na qual a velocidade da fosforilação oxidativa diminui enquanto a taxa de glicólise aumenta (HAY, 2016).

Wallace (2012) relata que a alta taxa de glicólise também pode ser explicada pelas mutações que ocorrem nas proteínas mitocondriais codificadas pelo DNA nuclear ou mitocondrial que reorientam o metabolismo nesta direção (CAREW, 2002). O genoma mitocondrial engloba cerca de 2.000 genes no DNA nuclear e mais algumas milhares de cópias do DNA mitocondrial. O DNA mitocondrial contém 13 dos principais genes envolvidos na fosforilação oxidativa, os demais estão presentes no núcleo. Mutações nos genes nucleares envolvidos no metabolismo mitocondrial, incluindo

succinato desidrogenase, fumarato hidratase e isocitrato desidrogenase podem contribuir para formação do tumor (WALLACE, 2012).

As células tumorais utilizam diversos mecanismos para aumentar o fluxo da glicose na via glicolítica. A atividade das enzimas envolvidas nas duas primeiras reações irreversíveis da glicólise (isoforma II da hexoquinase e fosfofrutoquinase I) está aumentada nestas células. A hexoquinase II possui a capacidade de se ligar a membrana externa da mitocôndria, utilizando, preferencialmente, o ATP produzido na fosforilação oxidativa, evidenciando o acoplamento entre a glicólise e a cadeia respiratória (HAY, 2016).

O aumento da expressão da hexoquinase II e da fosfofrutoquinase I induz o fluxo de glicose para várias vias metabólicas. A piruvato quinase M2 (uma das três isoformas das enzimas envolvida na última etapa irreversível da glicólise), ao contrário das demais, está diminuída. Esta atenuação direciona o metabolismo da glicose para diversas vias anabólicas. Para suprir essa deficiência, a expressão da enzima lactato desidrogenase (responsável pela conversão do piruvato em lactato) está aumentada em células tumorais. O lactato produzido é secretado, deslocando o equilíbrio para sua formação, promovendo a acidificação do meio que, em parte, induz proliferação do tumor (HAY, 2016).

As diferenças metabólicas em uma célula tumoral, tais como o redirecionamento da glicose descrito por Hay (2016), podem ser explorados no âmbito da terapia seletiva. Chen e colaboradores (2009) reportaram o efeito antitumoral de um potente inibidor da hexoquinase II, o 3-bromopiruvato. Como já descrito, as células tumorais dependem em maior proporção da via glicolítica para geração de ATP. Ao passo que a hexoquinase é uma enzima chave nesta via, um inibidor desta enzima pode desencadear a morte de células tumorais via depleção de ATP.

De fato, já foi demonstrado que a mitocôndria possui um papel importante no metabolismo da glicose. Dessa forma, a utilização desta organela como um alvo terapêutico pode ser uma estratégia fundamental no desenvolvimento de novas drogas de combate ao câncer (SHIM et al. 1997).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O presente estudo englobou três etapas bem definidas: i) síntese de nanobastões de ouro em meio aquoso; ii) modificação da superfície dos nanobastões; e iii) influência dos nanobastões em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Todas as reações de elaboração das nanoestruturas híbridas formadas pela associação de moléculas bioativas com as nanopartículas de ouro foram realizadas junto ao Grupo de Catálise e de Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (GCaR/IQB/UFAL). A avaliação da atividade em mitocôndrias isoladas foi executada no Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LaMP) do IQB/UFAL. As nanopartículas foram caracterizadas nos laboratórios do GCaR/IQB/UFAL, a exceção das micrografias de microscopia eletrônica de transmissão que foram realizadas no Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE) e no Instituto Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz/PE).

5.2 MATERIAL, SOLVENTES E REAGENTES

Toda vidraria utilizada para a síntese de nanobastões de ouro foi tratada com água régia, lavada com detergente e ambientada com água deionizada. A vidraria utilizada nos ensaios bioquímicos foi lavada cuidadosamente com água deionizada e etanol (70%). Os reagentes e solventes utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Reagentes e solventes

Reagente/Solvente	Marca
H ₂ AuCl ₄ .3H ₂ O, 99.9%	SIGMA - ALDRICH
NaBH ₄ , > 98%	ACROS ORGANICS
L(+)-ácido ascórbico P.A. 99+%	VETEC
Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 99+%	ACROS ORGANICS
AgNO ₃ , > 99%	REAGEN
Proteína Sérica Bovina (BSA) ≥ 96%	SIGMA - ALDRICH
Sacarose	NUCLEAR
EGTA	SIGMA - ALDRICH
HEPES	SIGMA - ALDRICH
KCl	DINÂMICA

MgCl ₂	SIGMA - ALDRICH
KH ₂ PO ₄	SIGMA - ALDRICH
K ₂ HPO ₄	SIGMA - ALDRICH
Piruvato	SIGMA - ALDRICH
Malato	SIGMA - ALDRICH
α-cetoglutarato	SIGMA - ALDRICH
Aspartato	SIGMA - ALDRICH
Succinato	SIGMA - ALDRICH
Rotenona	SIGMA - ALDRICH
Oligomicina	SIGMA - ALDRICH
Carboxicianeto-4-(trifluorometoxi)- fenilhidrazona (FCCP)	SIGMA - ALDRICH
Adenosina difosfato (ADP)	SIGMA - ALDRICH
Safranina ≥ 85%	SIGMA - ALDRICH
AmplexRed	MOLECULAR PROBES
Peroxidase (HRP)	SIGMA - ALDRICH
H ₂ O ₂	MERCK
H ₂ DCFDA	THERMO F SCIENTIFIC
Ácool etílico, 96%	DINÂMICA
Água deionizada	DEIONIZADOR DIRECT Q3 MILLIPORE

5.3 SÍNTESE DE NANOBASTÕES DE OURO

Nanobastões de ouro preparados em meio aquoso a partir do método mediado por semente desenvolvido por Jana e Murphy (2001). Este método envolve a redução do precursor metálico por um agente redutor fraco em presença de pequenos núcleos metálicos de 3 a 4 nm de diâmetro (sementes). Apenas na presença das sementes o agente redutor é capaz de reduzir o ouro para sua forma metálica sob a superfície desses núcleos (autocatálise), que começam a crescer. A presença de um agente direcionador de crescimento, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTABr), é fundamental para a formação de nanopartículas na forma de bastão. O CTABr interage preferencialmente pelas facetas laterais da partícula, bloqueando e diminuindo o processo de redução nestas regiões, promovendo, assim, um maior crescimento nas pontas que se encontram mais desimpedidas. Trata-se de um método relativamente simples e eficaz, no qual é possível obter o controle sobre o tamanho e a forma da partícula através de variações nas condições de síntese. O método pode ser descrito

em três etapas: i) solução semente; ii) solução de crescimento; e iii) formação dos nanobastões de ouro.

Solução Semente

As partículas sementes foram preparadas em meio aquoso através da redução de íons Au(III), usando como precursor o $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, em presença de NaBH_4 , um agente redutor forte. De forma geral, a solução semente é preparada em um tubo de vidro com capacidade para 15 mL onde são adicionados uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mL; 0,5 mM), seguido de uma solução de CTABr (2,5 mL; 0,20 M) e de uma solução gelada do agente redutor NaBH_4 (0,6 mL; 0,01M). O sistema permanece sob forte agitação durante 2 minutos. Nesta etapa o Au (III) em solução é reduzido para Au(0). A cor da solução muda imediatamente de amarelo escuro para castanho indicando a formação das partículas sementes. A solução assim obtida é acondicionada a temperatura ambiente por duas horas antes de iniciar a etapa subsequente.

Solução de Crescimento

Em um tubo de vidro são adicionados uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mL; 1 mM) e uma solução de CTABr (2,5 mL; 0,20 M), seguidos de uma solução de AgNO_3 (0,150 mL; 0,0040 M). Posteriormente, sob agitação, é adicionada a solução de ácido ascórbico (0,070 mL; 0,0788 M). Nestas condições, o ácido ascórbico é capaz de reduzir os íons de Au(III) para Au(I). Isso pode ser evidenciado através da mudança da coloração amarela para o incolor.

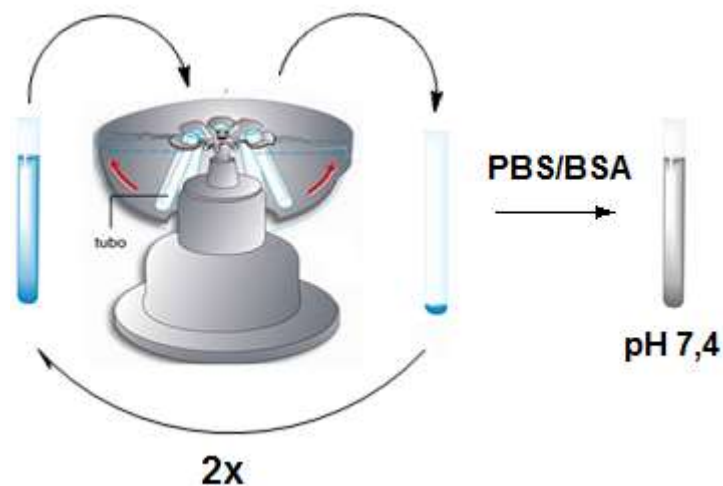
Formação dos nanobastões de ouro

A etapa final para preparação dos nanobastões de ouro é a adição da solução semente (0,060 mL) na solução de crescimento preparada anteriormente sob forte agitação durante 10 segundos. Finalmente, o sistema resultante foi mantido em repouso a temperatura ambiente durante um período de uma hora e então foi utilizado para os devidos estudos dentro de um período de até 48 horas.

5.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE

Uma vez que o CTABr é extremamente tóxico em ambiente biológico, se fez necessário a lavagem para remoção do excesso deste agente e a modificação da superfície dos nanobastões através da adição de proteína sérica bovina. Para tanto, os AuNRs formados e dispersos na solução anterior foram lavados duas vezes com água deionizada a 13.500 rpm por 15 minutos e incubados em tampão fosfato salino (PBS) com proteína sérica bovina (BSA) (8 mL; 1%) e o pH foi corrigido para 7,4. O esquema mostrado na figura 26 ilustra o procedimento adotado.

Figura 26 – Esquema de centrifugação e incubação dos AuNRs



Fonte: Google imagens, 2016

5.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Os nanobastões de ouro sintetizados em meio aquoso e modificados com BSA foram caracterizados por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e dispersão dinâmica da luz (DLS).

Espectroscopia por absorção na região do ultravioleta e visível (UV-vis)

As análises de espectroscopia por absorção no ultravioleta e visível foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu UV-3600 (UV-vis-NIR) com detectores para a região em estudo de PMT (photomultiplier tube) e InGaAs. As amostras foram acondicionadas em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Foi realizada uma varredura no intervalo de 1000 a 400 nm para evidenciar as bandas

características dos nanobastões de ouro. A cubeta com água deionizada foi utilizada como referência.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises dos AuNRs por microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI de 200 kV, modelo Tecnai 20, com emissor LAB₆ ou W, módulo EDAX, módulo de tomografia Xplore3D, suporte de aquecimento controlado, resolução de ponto de 0,2 nm e de linha 0,1 nm, com magnificação de até 1 milhão de vezes.

Pequenas quantidades das amostras foram depositadas em grades de cobre revestida com um filme de carbono (200 mesh) com o auxílio de uma haste artesanal de cobre. Após determinado tempo, as grades foram colocadas sob vácuo e encaminhadas para análise de MET. As medidas das partículas foram realizadas no programa ImageJ com uma média de, no mínimo, 200 contagens.

Dispersão dinâmica da luz (DLS)

O tamanho das partículas e o potencial zeta dos coloides foram realizados no Zetatrac/Microtrac. O Zetatrac possui uma cuba interna equipada com dois probes ópticos e de capacidade 0,7 – 3 mL de amostra e com a faixa de tamanho detectável entre 0,8 nm a 6,5 µM. O potencial zeta pode variar de -125 a +125 mV com acurácia de ± 3,8 mV.

5.6 INFLUÊNCIA DOS NANOBASTÕES EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATOS

Todos os ensaios bioquímicos descritos foram realizados em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

5.6.1 Animais

Ratos machos heterogênicos da linhagem Wistar foram retirados do biotério central da UFAL (Protocolo CEUA 63/2014) com média de 2 meses (peso < 200 mg) e encaminhados para o biotério setorial da ESENFAR onde foram acomodados em gaiolas confeccionadas em polipropileno (49 cm x 34 cm x 16 cm), com grade aramada em aço inoxidável.

Os animais ficaram alojados em no máximo cinco animais por gaiola, com alimento e água *ad libitum* sob temperatura controlada de 22 °C seguindo as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – Institute for Laboratory Anima Research*.

5.6.2 Isolamento de mitocôndrias hepáticas

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos Wistar utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo (Schneider & Hogeboom 1950). O fígado, retirado após a morte do animal por deslocamento cervical, foi lavado em solução de 250 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES, 0,5 mM de EGTA (pH 7,2), picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi posteriormente centrifugado a 2.500 g por 5 minutos. Descartou-se o precipitado e o sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10.000 g, sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 250 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES e 0,3 mM de EGTA (pH 7,2), e novamente centrifugado por 10 minutos à 10.000 g. A fração mitocondrial foi ressuspenso na mesma solução isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por mL. A suspensão mitocondrial foi utilizada em até 5 horas após o isolamento.

5.6.3 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Logo após o isolamento, a concentração de proteínas da suspensão mitocondrial foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando um espectrofotômetro com feixe duplo Shimadzu (UV-3600), equipado com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico no comprimento de onda de 595 nm. Uma curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA a (5 a 40 µg/mL foi utilizada como padrão, não admitindo $r < 0,97$.

Fundamento da técnica: o reagente Bradford possui como principal constituinte o corante azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250) em solução ácida. No pH de reação, a interação deste corante com uma proteína de alta massa molecular (grupos funcionais básicos ou aromáticos) provoca o deslocamento do equilíbrio do

corante para forma aniônica, causando um aumento na absorvância da luz no comprimento de onda de 595 nm. A unidade de absorvância é diretamente proporcional à concentração de proteínas da amostra, de acordo com a lei de Lambert Beer com limite de detecção de $2 \cdot 10^{-5}$ mg/L.

5.6.4 Ensaio com mitocôndrias

Todos os ensaios bioquímicos foram realizados a uma concentração de 0,5 mg proteína/mL e em um meio de reação padrão (meio de reação) composto por sacarose 125 mM, KCl 60 mM, $MgCl_2$ 1mM, K_2HPO_4 2mM, e HEPES 10 mM, pH 7,2 à temperatura ambiente.

5.6.5 Exposição aos nanobastões de ouro

Todos os ensaios bioquímicos foram realizados em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (*ex vivo*). Os animais não receberam qualquer tratamento prévio até o momento da eutanásia. Dessa forma, o homogenato de mitocôndrias isoladas (0,5 mg proteína/mL) derivado destes animais foi exposto a diferentes concentrações de nanobastões de ouro (de 6,25 a 100 μ M de ouro).

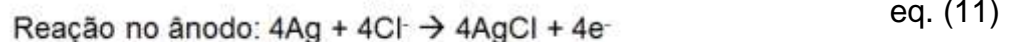
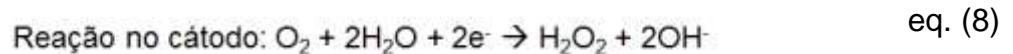
5.6.6 Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo OXIGY Oxygraph (Hansateh Instrument, EUA), em uma câmara de vidro de 1,0 mL equipada com agitador magnético e termostatizada (28 °C). A concentração de oxigênio inicial no meio de reação é de 225 nmol/mL (Robinson & Cooper 1970).

A influência dos AuNRs no consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliada frente ao primeiro complexo da cadeia transportadora de elétrons, NADH desidrogenase (complexo I). Inicialmente para avaliação do complexo I, as mitocôndrias isoladas (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio de reação acrescido de EGTA (200 μ M) e substrato para tal complexo (5 mM – piruvato/malato/glutamato/ α -cetoglutarato 1/2/1/1), ADP (250 μ M), oligomicina (1 μ g/mL) e CCCP (1 μ M) foram adicionados em sequência em intervalo médio de 5 min entre eles. Já para avaliação do complexo II, o substrato ofertado foi substituído pelo succinato (5 mM) acrescido de rotenona (0,2 μ M) como

inibidor do complexo I. Para ambos os complexos, os AuNRs foram adicionados logo após a adição do homogenato de mitocôndrias.

Fundamento da técnica: o oxigênio dissolvido na câmara é determinado através de um sensor eletroquímico baseado no eletrodo de Clark. Este eletrodo possui um cátodo de platina (metal nobre) acoplado a dois ânodos de prata. Quando um potencial elétrico negativo (0,8 V) é aplicado ao cátodo de platina em relação ao eletrodo de referência (Ag/AgCl) em uma solução de KCl, o oxigênio dissolvido no líquido é reduzido na superfície do catodo conforme as equações 8, 9, 10, 11 e 12. O fluxo de elétrons do ânodo para o cátodo produz uma corrente elétrica proporcional a quantidade de oxigênio que se difunde através da membrana permeável a gás, possibilitando a sua quantificação.



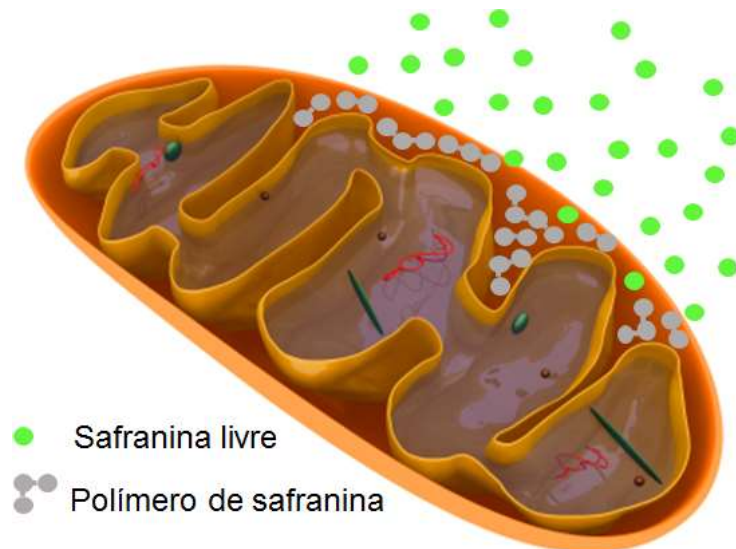
5.6.7 Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi estimado pela variação da fluorescência da safranina, registrada através de um espectrofluorímetro (Shimadzu RF, modelo 5301PC, Tóquio, Japão), operando em um comprimento de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm, respectivamente, com *slit* de 5 nm (FIGUEIRA et al. 2012; ZANOTTI et al. 1980). O homogenato de mitocôndrias (0,5 mg proteína/mL) foi incubado no meio padrão de reação acrescido de substrato (piruvato 0,34 mM, malato 0,68 mM, glutamato 0,34 mM e α -cetoglutarato 0,34mM) contendo safranina O a 10 μM . As diferentes doses de AuNRs foram adicionadas antes da adição da safranina.

Fundamento da técnica: O método consiste no monitoramento das alterações da fluorescência da safranina O. A safranina é um composto catiônico capaz de ser atraído pelo potencial eletroquímico negativo do interior da mitocôndria. Acredita-se que no espaço intramembranar, as altas concentrações de safranina formem multímeros não fluorescentes (Fig. 27). À medida que a mitocôndria perde seu

potencial eletroquímico, a interação eletrostática com a safranina diminui, sendo esta liberada para o meio o que resulta no aumento da fluorescência. Sendo assim, a dissipação do potencial de membrana correlaciona-se com o aumento da intensidade de fluorescência do probe (COLLONA et al. 1973).

Figura 27 – Esquema ilustrando a formação dos polímeros de safranina



Fonte: AUTOR, 2016

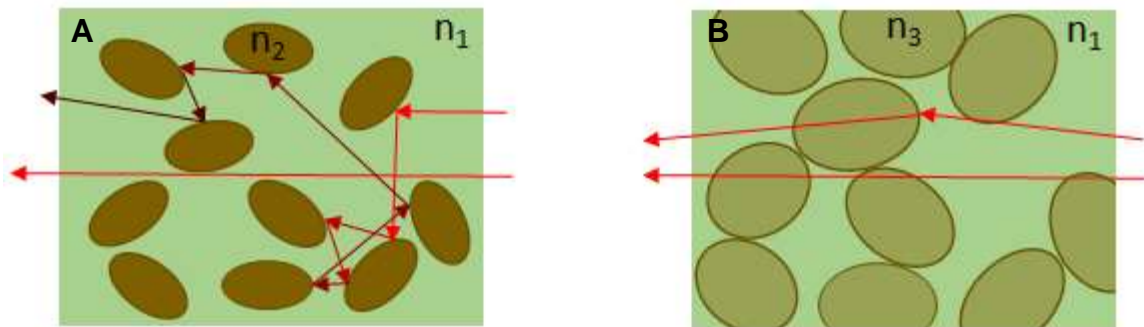
5.6.8 Medida de inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi evidenciado utilizando um espectrofotômetro com feixe duplo Shimadzu (UV-3600) equipado com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico no comprimento de onda de 520 nm. O homogenato de mitocôndrias foi adicionado ao meio de reação (0,5mg proteína/mL) em presença de substrato para o complexo I (piruvato 0,34 mM, malato 0,68 mM, glutamato 0,34 mM e α -cetoglutarato 0,34mM). Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

Fundamento da técnica: As suspensões mitocondriais espalham a luz incidente, tal luz é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada, aumentar a transmitância e como consequência diminuir a absorbância (Fig. 28). À medida que a perda da integridade mitocondrial ocorre, as mitocôndrias começam a inchar. O inchamento mitocondrial torna a solução menos turva, permitindo uma maior

passagem de luz, criando uma relação inversamente proporcional entre o inchamento e a absorbância (WILSON et al. 2005).

Figura 28 – Esquema ilustrando a relação do inchamento mitocondrial com a luz. O aumento do volume mitocondrial (B) torna o índice de refração da dispersão ($n_3 < n_2$) menor, levando a diminuição da absorbância da luz.



Fonte: AUTOR, 2016

5.6.9 Estimativa da produção das espécies reativas de oxigênio (EROS)

A geração de EROS foi monitorada espectrofluorimetricamente (Shimatsu RF5300), utilizando-se dois probes: i) H₂-DCFDA e ii) Amplex Red.

H₂-DCFDA – O H₂-DCFDA apresenta uma detecção pouco específica para um único tipo de EROS. O H₂-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 1 μ M) (Lebel et al. 1992) teve sua fluorescência monitorada num comprimento de onda de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com a largura da fenda de 2,5 nm. A calibração foi realizada pela adição de concentrações conhecidas de diclorofluoresceína (DCF), o produto da oxidação do H₂-DCFDA.

Fundamento da técnica: O reagente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCFDA) é a forma química reduzida da fluoresceína. As EROS (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻) produzidas na mitocôndria são capazes de clivar os grupamentos acetatos do H₂-DCFDA não fluorescente, gerando a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente. Dessa forma o aumento da fluorescência nestes estudos está intimamente relacionado a produção de EROS

(LEBEL et al. 1992). Através da elaboração de uma curva de calibração é possível quantificar as EROS produzidas.

Amplex Red - A geração de H_2O_2 foi monitorada espectrofluorimetricamente utilizando-se o probe Amplex Red (N-acetil-3,7-dihydroxyphenoxazine, 50 μ M) na presença de peroxidase (HRP) (1 U/mL) (ZHOU et al. 1997). A fluorescência foi monitorada num comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 nm. A calibração foi realizada pela adição de concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

Fundamento da técnica: o Amplex-Red é um reagente incolor capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em presença de peroxidase, gerando como produto a resorufina, um composto extremamente fluorescente. O aumento da fluorescência é diretamente proporcional à produção de H_2O_2 . O H_2O_2 produzido pode ser quantificado através de uma curva de calibração.

5.6.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Mitocôndrias

O homogenato de mitocôndria foi incubado com as nanopartículas e posteriormente foram fixados durante a noite numa solução contendo 2,5% de glutaraldeído e paraformaldeído a 4% em tampão de cacodilato 0,1 M. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes no mesmo tampão e em seguida, eles foram pós-fixados numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, cloreto de cálcio 2 mM e ferricianeto de potássio a 0,8% em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,2, lavadas três vezes em tampão cacodilato (0,1 M). Em seguida foram contrastadas com 5% de acetato de uranilo e citrato de chumbo, lavadas três vezes no tampão cacodilato (0,1 M), desidratadas em acetona, e embebidas em Embed 812. a polimerização foi realizada a 60 ° C durante 3 dias. Secções ultrafinas foram recolhidos em grades de níquel 300-mesh e examinadas usando um microscópio electrónico de transmissão FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados dos parâmetros bioenergéticos foram expostos como a média de no mínimo três experimentos independentes. A análise estatística destes dados foi determinada pela análise da variância (ANOVA), seguida do post-test de Dunnet comparando grupo controle com os grupos em diferentes concentrações das nanopartículas de ouro. Resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram mensuradas utilizando o programa ImageJ e o único grupo tratado foi comparado ao controle através do Test t Student. O software utilizado para os estudos estatísticos foi o GraphPad Prism versão 5.0 para Windows. Os demais espectros foram todos plotados no Origin versão 6.0 para Windows.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

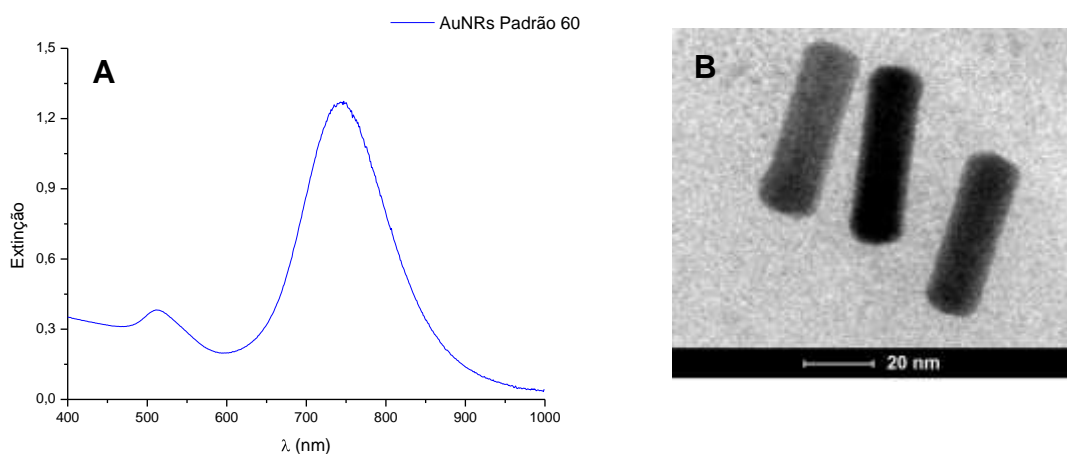
6.1 SÍNTESE DE NANOBASTÕES:

Através da adaptação do método de Murphy e colaboradores (2003) foi possível obter AuNRs com um elevado grau de homogeneidade e controle de tamanho com uma seletividade de 90%.

Após uma hora de preparo, os AuNRs foram caracterizados por espectroscopia de ultravioleta e visível (UV-Vis) (Fig.29A). O espectro de absorção mostra duas bandas de intensidades diferentes. Como Pereira (2009) e El-Sayed (2009) afirmaram, a presença de duas bandas de absorção é característica de nanopartículas anisotrópicas ou elipsoides.

Murphy et al. (2001), em seus primeiros estudos no desenvolvimento de uma rota sintética para a preparação de AuNRs, e El-Sayed et al. (2002), avaliando a influência de dois surfactantes (CTAB e BDAC), obtiveram espectros de UV-Vis para nanobastões de ouro semelhantes ao obtido neste presente estudo, indicando a formação de nanobastões.

Figura 29 – (A) Espectro de UV-Vis dos nanobastões de ouro sintetizados e (B) sua respectiva micrografia de MET



Fonte: AUTOR, 2016

Os dois comprimentos de onda máximos referentes à ressonância de plásmom transversal e longitudinal, respectivamente, foram de 513 e 747 nm (Tabela 3). Da Silva et al. 2013, avaliando a influência da quantidade de partículas sementes no

processo de crescimento de nanobastões, relataram uma variação no comprimento de onda máximo alusivo à primeira banda de 509 à 516 nm, enquanto a segunda banda atingiu uma variação de 650 à 784 nm.

A espectrofotometria de UV-Vis é uma ferramenta muito importante e acessível para a caracterização de nanopartículas de ouro em geral. Contudo, o espectro de um coloide obtido por esta técnica apenas sugere a possível morfologia da nanopartícula. A fim de certificar-se da morfologia das nanopartículas obtidas, foi realizado um estudo por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As imagens obtidas no MET corroboram com os espectros de UV-Vis, em que é possível identificar, com clareza, a presença de partículas abastoadas (Fig.29B).

Tabela 3 – Características dos nanobastões obtidos

Amostra	$\lambda_{\max 1}$ (nm)	$\lambda_{\max 2}$ (nm)	Comprimento (nm)	Razão C/L
AuNRs	513	747	42 ± 4	3,7

Fonte: AUTOR, 2016

Através de uma análise estatística, 200 nanobastões foram mensurados nas imagens obtidas na MET (Fig. 29B), verificou-se um comprimento médio para nanobastões de 42 nm e razão comprimento/largura (C/L) de 3,7. As caracterizações por dispersão dinâmica da luz (DLS) demonstraram um diâmetro hidrodinâmico médio de partícula anisotrópica de 43 nm.

Os estudos de caracterização dos sistemas coloidais de ouro, preparados pelo método mediado por semente, revelaram a eficiência deste método para a produção de nanobastões de ouro com alto grau de seletividade e homogeneidade.

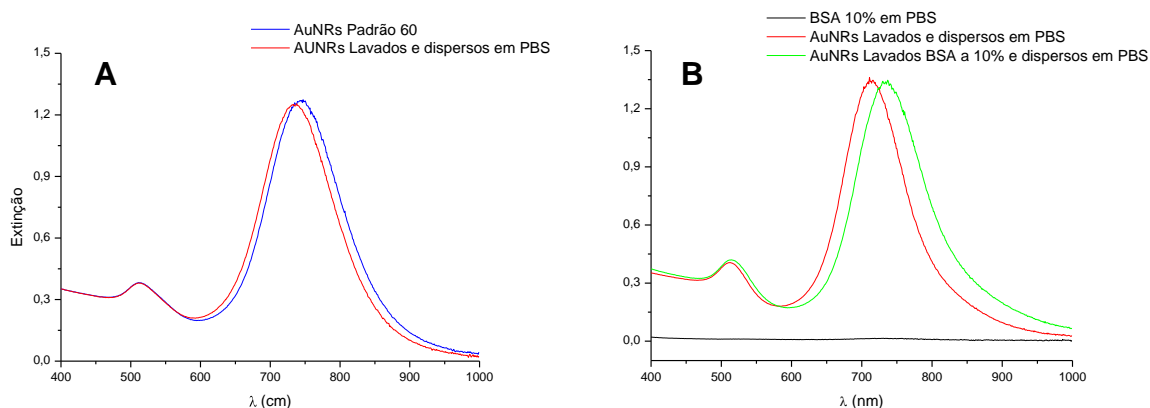
6.2 TRATAMENTO COM PROTEÍNA SÉRICA BOVINA (BSA):

A presença do CTABr na superfície dos AuNRs confere a eles um alto grau de citotoxicidade. Dessa forma, existe a necessidade de modificar a superfície dessas nanopartículas. O uso da albumina sérica bovina (BSA) como agente modificador da superfície de nanopartículas de ouro já tem sido reportado na literatura por diversos grupos.

No presente estudo, os nanobastões de ouro sintetizados foram lavados para a remoção do CTABr residual. O sistema foi caracterizado por espectroscopia de UV-Vis antes e após as lavagens. O espectro dos AuNRs lavados com água e redispersos

em PBS no mesmo volume inicial (Fig. 30A, em vermelho) revelou que não há significativa alteração das duas bandas de absorção se comparado à solução-mãe (Fig. 30A, em azul), tanto em termos de λ_{\max} , quanto em termos de intensidade.

Figura 30 – Espectros de UV-Vis de nanobastões de ouro. (A) Comparação antes e após a lavagem e (B) comparação com os AuNRs tratados com BSA



Fonte: AUTOR, 2016

A lavagem com água deionizada é um passo importante na “detoxificação” dos AuNRs. Nesse processo, as estruturas moleculares de CTABr não ancoradas nos AuNRs, são retidas com a remoção do sobrenadante após as sucessivas lavagens. Além do CTABr, outras substâncias presentes em excesso durante a síntese também são eliminadas.

Os resultados da lavagem sugerem que a solução coloidal de nanobastões se mostra relativamente estável no tampão PBS, sem modificações espectrais significativas.

Em seguida, os AuNRs lavados foram incubados em uma solução de tampão fosfato salino (PBS) e BSA a 10%, e o pH foi corrigido para 7,4. Para fins comparativos, a mesma solução na ausência de AuNRs foi caracterizada por espectroscopia de UV-Vis. O espectro correspondente a ausência de AuNRs (Fig. 30B, em preto) demonstrou-se semelhante à linha de base, quase paralelo ao eixo x. Em contrapartida, os nanobastões, em presença de BSA (Fig. 30B, em verde), apresentaram um deslocamento batocrômico ($> \lambda$) de ca. 20 nm (Fig. 30B), sem efeitos significativos na intensidade das bandas.

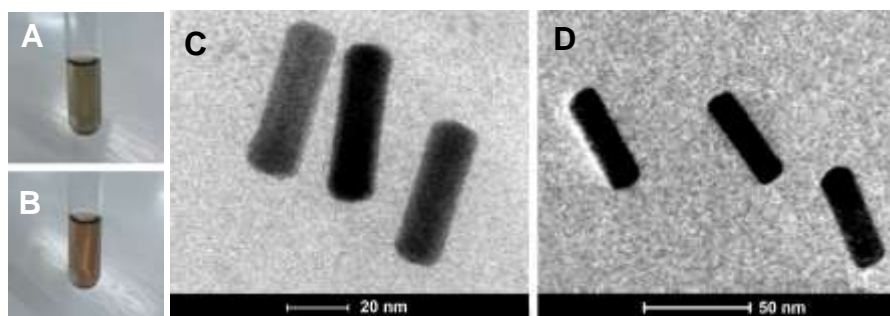
O espectro de BSA sem AuNRs (30B, em preto) não apresentou nenhuma absorção significativa na faixa avaliada (400 – 1000 nm). A maioria das proteínas apresenta uma forte absorção da luz em um comprimento de onda médio de 280 nm. Nelson e Cox (2014) atribuem essa propriedade espectroscópica a presença dos aminoácidos triptofano, tirosina e, em menor extensão, a fenilalanina. Dessa forma, a presença de BSA no sistema coloidal não interfere significativamente nas intensidades das bandas dos AuNRs.

Após o tratamento com a BSA, os AuNRs apresentaram um deslocamento significativo da segunda banda. Wang e colaboradores (2007) reportaram que o plásmon de superfície longitudinal dos nanobastões pode estar associado a dois fatores: i) modificação da taxa de proporção dos AuNRs ou; ii) modificações nas propriedades dielétricas da sua vizinhança, incluindo solventes, moléculas de superfície e distância entre partículas.

Da Silva et al (2013) descreveram a cinética de crescimento dos nanobastões de ouro através do UV-Vis. Durante o processo de crescimento, a banda longitudinal dos AuNRs se desloca em um primeiro momento para comprimentos maiores e, em um segundo momento, para comprimentos menores. Esse fato foi atribuído ao crescimento inicial longitudinal, seguido de um crescimento lateral. Todavia, no nosso sistema, todo o ouro foi completamente reduzido, impossibilitando um novo crescimento. Assim, esse deslocamento está diretamente relacionado ao segundo fator descrito por Wang et al. (2007), a influência da BSA no plásmon superficial das partículas. A presença desta macromolécula volumosa é capaz de alterar a dinâmica de oscilação dos elétrons na superfície metálica. O mesmo resultado foi encontrado por Wang et al. (2011) que observaram um deslocamento médio de 20 nm na segunda banda do bastão durante a incubação com 10% de BSA. Wang et al. (2007) observaram o mesmo efeito batocrômico quando nanobastões de ouro foram modificados com estreptavidina, uma proteína tetramérica bacteriana.

A solução de AuNRs tratados com BSA apresentou uma mudança em sua coloração saindo do marrom para o castanho escuro (Fig. 31A e B). Os comprimentos de onda da luz visível são classificados segundo a cor, do violeta (400 nm) ao vermelho (700 nm). Dessa forma, esta propriedade organoléptica é muito importante e pode ser utilizada com uma ferramenta de caracterização adicional. A variação para o castanho escuro está diretamente relacionada ao deslocamento de 20 nm na região visível do espectro eletromagnético, corroborando com os estudos no UV-Vis.

Figura 31 – Sistema coloidal (A) antes e (B) após o tratamento com BSA. Imagens de MET de nanobastões de ouro (C) antes e (D) após o tratamento com BSA.



Fonte: AUTOR, 2016

O sistema coloidal sem modificações e tratado com a BSA também foi caracterizado por MET e DLS. O diâmetro hidrodinâmico encontrado pela análise de DLS para os bastões, foi semelhante com e sem tratamento, 43 e 41 nm, respectivamente (Tabela 4). Nas imagens de MET foi possível identificar bastões bem definidos e uniformes, não demonstrando variações significativas (Fig. 31C e D).

Tabela 4 – Diâmetro hidrodinâmico dos nanobastões de ouro

Amostra	Diâmetro (nm)
AuNRs	43
AuNRs@BSA	41

Fonte: AUTOR, 2016

O tratamento dos AuNRs, nos possibilitou entender a estabilidade dos nanobastões no processo de lavagem e em meio PBS. Também foi possível evidenciar que a interação da BSA com os AuNRs promove uma alteração do plásmon de superfície longitudinal, que evidencia a presença desta proteína na superfície da partícula. As imagens de microscopias e as análises de DLS não demonstraram modificação significativa no tamanho, nem na forma da partícula.

6.3 MODELO EXPERIMENTAL:

O modelo experimental utilizado neste projeto permite o entendimento da ação dos AuNRs em ambiente biológico, em uma condição de *ex vivo*, sendo uma ótima

ferramenta para avaliação de uma possível ação tóxica dos AuNRs via mitocôndria. Foram utilizados ratos Wistar da linhagem *Rattus norvegicus*. Os ratos foram retirados do biotério central (BIOCEN) com 50 – 60 dias e foram utilizados em estudos experimentais no intervalo de 60 a 80 dias de idade. De acordo com a relação de idade dos ratos a idade humana descrita por Lopes e colaboradores (2012), os animais utilizados neste estudo possuem, em média, 9 – 10 anos de idade humana.

6.4 RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL:

A maior parte do ATP formado na mitocôndria é sintetizado na cadeia respiratória. Os complexos da cadeia respiratória oxidam os substratos respiratórios em uma cascata de oxidações e reduções sucessivas no qual o acceptor final de elétrons é o O_2 formando H_2O .

No presente estudo verificamos o efeito dos AuNRs na respiração de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (MFR), mais especificamente na atividade do complexo I através do consumo de oxigênio, quando ofertamos substrato para tal complexo.

O consumo de oxigênio avaliado no oxígrafo seguiu a sequência de estados adaptada de Chance (1995). Inicialmente foram adicionados EGTA e substratos para o complexo I (SI) seguidos da adição de mitocôndrias (MITO) e AuNRs. A adição da mitocôndria naturalmente dá início ao consumo de oxigênio a uma velocidade basal, chamada de V_2 . Posteriormente o ADP foi adicionado provocando um intenso declive da curva, correspondente ao intenso consumo de oxigênio. A derivada desta curva, é dado o nome de V_3 . Logo após a bruta queda, a curva incia uma tendência de platô paralelo ao eixo x, a derivada deste intervalo é chamada de V_4 . Oligomicina foi adicionada para aumentar ainda mais esse platô, V_{OLIGO} . Ao final do processo, o desacoplador químico CCCP foi adicionado, provocando um efeito similar a V_3 que é conhecido como V_{CCCP} (Fig. 32A).

Avaliando o consumo de oxigênio total pela diferença entre a concentração de O_2 no início da corrida e no final, é possível verificar um decréscimo neste consumo em função do aumento da concentração de AuNRs (Fig. 32A). No gráfico que representa o controle na ausência de AuNRs (em preto), por exemplo, podemos evidenciar o consumo de oxigênio total de 80 nmols ($\Delta[O_2] = 225 - 145$). Em contrapartida no gráfico equivalente a maior concentração de AuNRs (100 μM , em

rosa) a quantidade de oxigênio consumida em toda corrida foi em torno de 18 nmols ($\Delta[\text{O}_2] = 225 - 207$). Conforme esses resultados, os AuNRs, na concentração de 100 μM foram capazes de diminuir o consumo de oxigênio total em cerca de 77,50 %. Esse é um achado que indica que os AuNRs estão atuando no funcionamento da fosforilação oxidativa mitocondrial. Todavia, para tentar desvendar o mecanismo pelo qual essas nanopartículas atuam, foi necessário investigar sua influência em cada estado respiratório.

O estado V_3 é caracterizado pela velocidade de fosforilação do ADP. O ADP adicionado à solução promove a ativação da ATP-sintase que induz o influxo de prótons para dentro da matriz mitocondrial através da catálise rotacional. O incremento da concentração de prótons na matriz, aumenta a atividade dos complexos multienzimáticos da cadeia transportadora de elétrons, bombeando-os de volta ao espaço intermembrana, levando ao aumento no consumo de oxigênio no complexo IV. O efeito dos AuNRs sobre V_3 foi extremamente significativo e inversamente proporcional. O consumo de oxigênio (nmols/min/mg) neste estado diminuiu à medida que a concentração de AuNRs aumentou: Controle 9,354 ($\pm 1,039$); 6,25 μM de AuNRs 7,620 ($\pm 0,622$); 12,5 μM de AuNRs 7,024 ($\pm 0,251$); 25 μM de AuNRs 4,766 ($\pm 0,487$); 50 μM de AuNRs 2,605 ($\pm 0,532$); 100 μM de AuNRs 2,156 ($\pm 0,455$). A maior concentração de AuNRs estudada neste experimento reduziu V_3 em ca. 76,95 %. Todos os grupos foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle (Fig. 32B).

A influência da ação dos AuNRs sobre V_3 pode ser explicada através de dois mecanismos: i) via inibição da ATP-sintase; ou ii) via inibição da transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons.

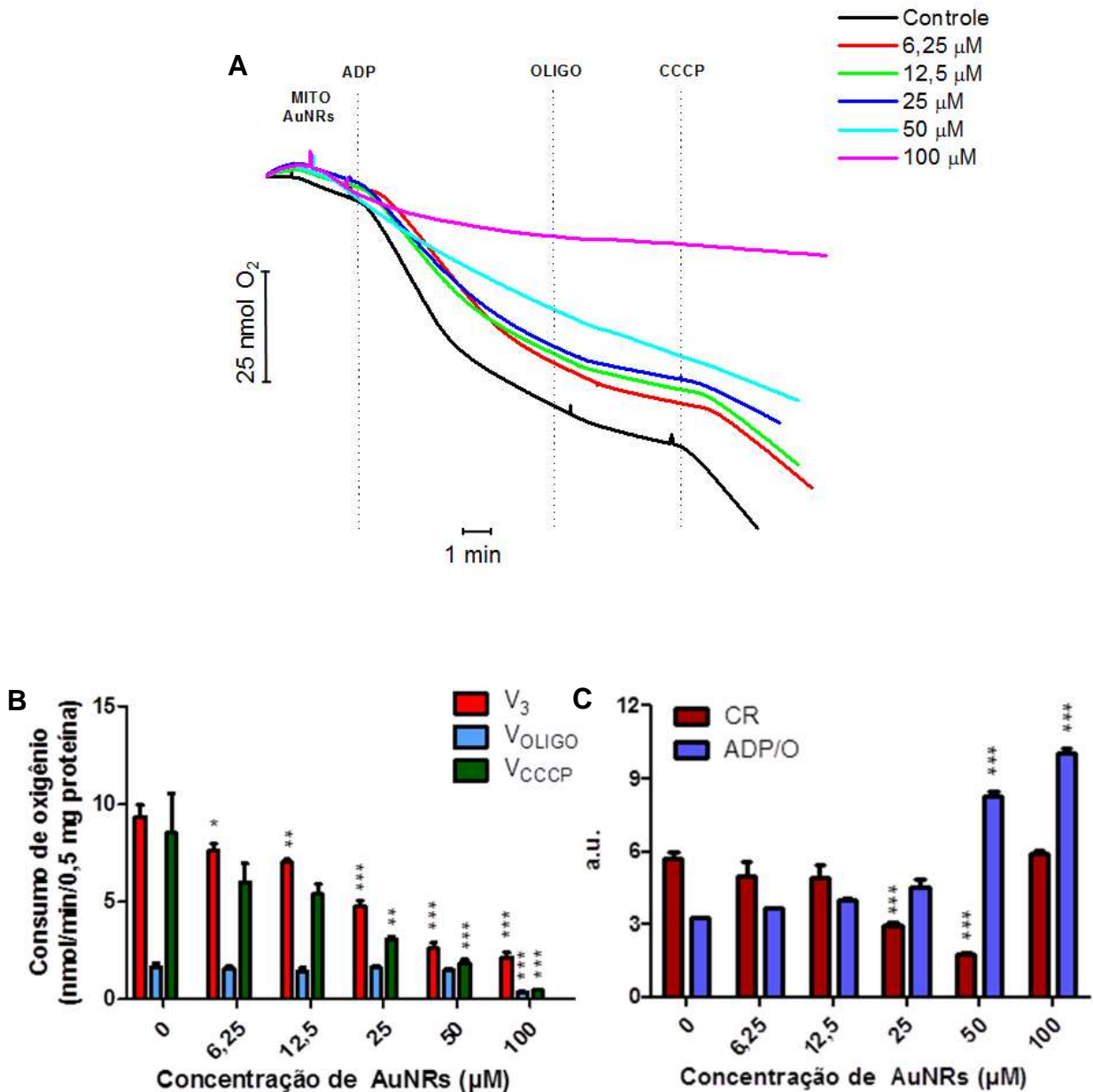
Maioli (2012) investigando o papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina, obteve uma diminuição de V_3 . O mecanismo de ação da abamectina, um agente antiparasitário e inseticida, está centrado em seu efeito inibidor da ATP-sintase. Os inibidores exclusivos da ATP-sintase, tal como a oligomicina, não são capazes de exercer efeito sob a velocidade de desacoplamento (V_{CCCP}), pois em presença de um desacoplador químico (CCCP), a cadeia respiratória está em pleno funcionamento independente da ATP sintase, sendo este um parâmetro importante para diferenciar os dois mecanismos.

As velocidades de repouso (V_4 e V_{OLIGO}) não sofreram variações significativas, em nmols de O_2 consumido, quando em presença de AuNRs: Controle 1,664 (\pm

0,305); 6,25 μM de AuNRs 1,556 ($\pm 0,225$); 12,5 μM de AuNRs 1,456 ($\pm 0,272$); 25 μM de AuNRs 1,610 ($\pm 0,177$); 50 μM de AuNRs 1,468 ($\pm 0,194$); 100 μM de AuNRs 0,366 ($\pm 0,078$) (Fig. 34B). A maior variação entre as velocidades de repouso foi encontrada com valor de 0,208 nmols de O_2 entre a concentração de 12,5 μM de AuNRs e o Controle. A exceção foi evidenciada na maior concentração de AuNRs (100 μM) na qual a velocidade de repouso obteve um valor estatisticamente significativo próximo a zero.

Grande parte das drogas com alvo mitocondrial provocam o aumento da velocidade de repouso. Esse aumento pode ser explicado pela capacidade destas drogas em promover a entrada de prótons independente da ATP sintase, proporcionando o consumo de oxigênio.

Figura 32 – Nanobastões de ouro revestidos com BSA (AuNRs) diminuem a respiração mitocondrial. MFR (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C contendo substratos para o complexo I 5mM, EGTA 200 µM, ADP 250 µM e oligomicina 1 µg/mL. **Painel A:** Figura é representativa de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. A presença dos AuNRs provocou uma diminuição no total de oxigênio consumido de forma dose-dependente. **Painel B:** Velocidades de consumo de oxigênio nos estados II, IV e V_{CCCP}. **Painel C:** Razão ADP/O e Controle Respiratório. As barras representam a média ± S.D. (n = 3). p < 0,05 quando todos os grupos foram comparados ao controle de acordo com teste One-Way ANOVA e post hoc de Dunnett. MITO = Mitocôndria.



Uyemura et al. (1996), investigando a interação de antiinflamatórios não-esteroidais, com a fosforilação oxidativa de mitocôndrias renais de rato, observaram que a dipirona era capaz de aumentar a V_4 . Esse resultado levou os autores a concluir que os efeitos tóxicos renais da dipirona podem estar relacionados ao seu mecanismo de desacoplamento mitocondrial. Reis (2014) também observou o aumento de V_4 quando o composto triacsin C, um potente inibidor da enzima acil CoA sintetase (enzima da β -oxidação), foi adicionado a mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Contudo, não foram observadas variações significativas entre a maior parte das concentrações na velocidade de repouso em nossos experimentos. Esse resultado sugere que os AuNRs não atuam como desacopladores.

A velocidade de desacoplamento (V_{CCCP}) naturalmente possui valor semelhante a V_3 . Em ambos estados, a cadeia respiratória está em capacidade máxima, lembrando que em V_{CCCP} não está ocorrendo síntese de ATP. Nos resultados obtidos com AuNRs, V_{CCCP} apresentou um comportamento semelhante a V_3 , ou seja, os AuNRs provocam uma diminuição desses dois estados na mesma razão: Controle 8,535 (\pm 2,836); 6,25 μ M de AuNRs 6,020 (\pm 1,630); 12,5 μ M de AuNRs 5,387 (\pm 0,930); 25 μ M de AuNRs 3,078 (\pm 0,259); 50 μ M de AuNRs 1,874 (\pm 0,289); 100 μ M de AuNRs 0,471 (\pm 0,026) (Fig. 32B).

Em uma condição normal, a entrada de prótons, induzida pelo CCCP, provoca um aumento drástico no consumo de oxigênio. Dessa forma, se os complexos enzimáticos estivessem em pleno funcionamento, o consumo de oxigênio neste estado deveria permanecer intenso e inalterado. Todavia, a presença de AuNRs foi capaz de reduzir o consumo de oxigênio neste estado, sugerindo que os AuNRs interagem com os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons, diminuindo a sua atividade.

Bourdineaud, Rossignol e Brèthes (2013) obtiveram um resultado semelhante quando examinaram o efeito de nanopartículas de ouro, como poluentes do microambiente aquático do zebrafish, na mitocôndria isolada do músculo destes peixes. Segundo este grupo, nanopartículas esféricas de ouro com diâmetro de 50 nm foram capazes de causar diminuição em V_3 e V_{CCCP} . Nanopartículas de 12 nm não causaram o mesmo efeito, levando-os a concluir que o tamanho da partícula e a sua concentração influenciam diretamente na sua toxicidade.

Um dos principais parâmetros para determinação da viabilidade mitocondrial é o controle respiratório (CR). O CR pode ser calculado a partir da razão entre a

velocidade de fosforilação e a velocidade de repouso (V_3/V_4). Para o complexo I, as mitocôndrias isoladas de fígado de rato são consideradas ideais quando possuem valores de CR próximos a 6. Um segundo parâmetro bioenergético importante é a razão entre a concentração de ADP, adicionada no estado 3, e a concentração de oxigênio consumida neste mesmo estado. Para o complexo I, a razão ADP/O encontra valores satisfatórios próximos a 3 (ESTABROOK, 1967).

Como pode ser observado na Figura 32C, o CR diminui à medida que a concentração de AuNRs aumenta. Isso ocorre porque a variável presente no numerador (V_3) é decrescente, enquanto o denominador (V_4) permanece constante. A razão ADP/O, por outro lado, possui uma tendência contrária. Esse aumento na razão ADP/O é decorrente da diminuição do consumo de oxigênio nas mitocôndrias tratadas com AuNRs.

Contudo, a maior concentração de AuNRs (100 μM) apresenta um CR semelhante ao controle, impulsionando-nos a erroneamente acreditar que, nesta condição, as mitocôndrias permanecem inalteradas. Isso ocorre principalmente porque na concentração de 100 μM de AuNRs o gráfico (Fig. 32A, em rosa) no oxígrafo perde completamente o seu perfil de consumo de O_2 . Apenas neste caso, tanto V_3 , V_4 e V_{CCCP} são diminuídas. Dessa forma, a razão entre dois valores pequenos ($\text{CR} = V_3/V_4$) pode gerar um valor maior. A contraprova disso é a razão ADP/O que possui seu maior valor dentre todas as concentrações, particularmente devido a drástica diminuição no consumo de oxigênio.

De fato, todos os resultados de respiração indicam que a ação deletéria dos AuNRs sobre o consumo de oxigênio está atrelada a sua interação com os complexos enzimáticos da cadeia. Todavia, a natureza da interação ainda permanece em dúvida. Acredita-se que os nanobastões de ouro são capazes de interagir com os grupamentos tiólicos, fenômeno descrito por Matthiesen e colaboradores (2013), presentes nos complexos enzimáticos. A interação dos nanobastões com esses grupos, incluindo os centros de ferro-enxofre, pode provocar uma mudança conformacional dos complexos proteicos alterando seu potencial de oxi-redução. Essas alterações podem ser capazes de diminuir o fluxo de elétrons entre os complexos convergindo para diminuição do consumo de oxigênio.

Os resultados de respiração mitocondrial para o complexo I demonstraram uma diminuição nas velocidades de fosforilação (V_3) e desacoplamento (V_{CCCP}), tal efeito é proporcional a concentração de AuNRs, indicando que as AuNRs estão interagindo

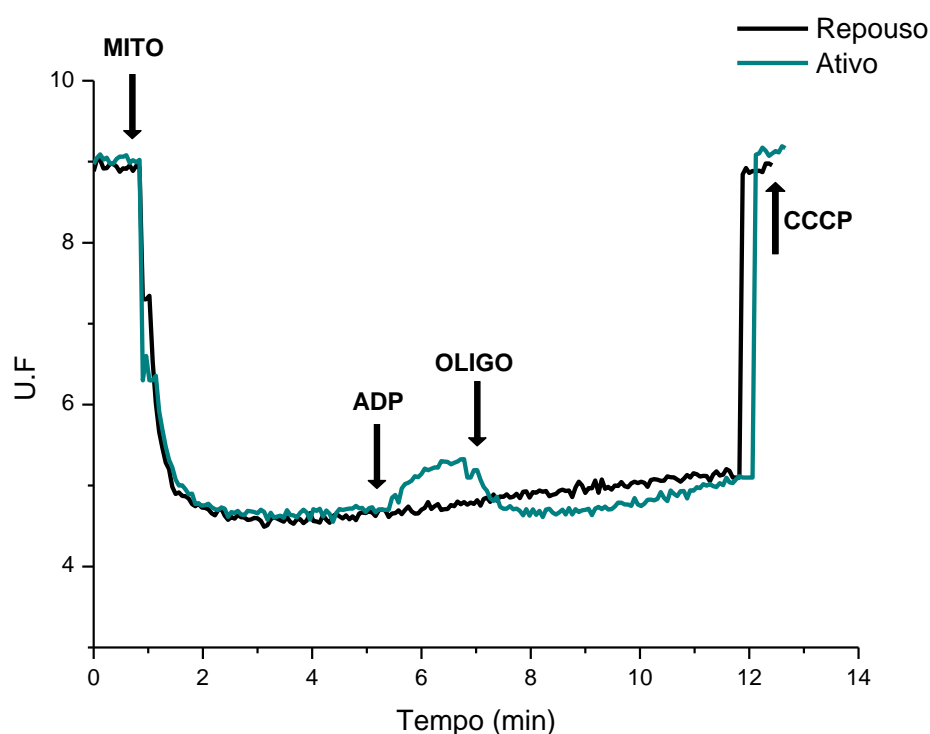
com os complexos enzimáticos, afetando diretamente o funcionamento da cadeia respiratória (ver Anexo 1). O real mecanismo molecular ainda não está evidenciado, mas supõe-se que os complexos enzimáticos da cadeia respiratória possam ser capazes de interagir com a superfície do ouro (por coordenação ou oxidação entre os átomos de Au e S) formando um conjunto estável e menos ativo metabolicamente. A diminuição do controle respiratório (CR) e o aumento da razão ADP/O são indícios de que os AuNRs estão afetando a funcionalidade da mitocôndria. Embora a concentração de 100 μ M de AuNRs tenha apresentado um CR semelhante ao controle, a sua razão ADP/O está muito alta. Esse aumento é reflexo da diminuição do consumo de oxigênio mitocondrial como consequência da presença das nanopartículas, apresentando, nesta concentração, o efeito mais deletério.

6.5 POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

A manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) é fundamental para a síntese de ATP e viabilidade da mitocôndria, por isso trata-se de uma ferramenta importante na avaliação da integridade mitocondrial. A perda da manutenção do potencial de membrana pode levar, em última instância, à morte celular. Esse potencial pode ser estimado pela variação da fluorescência da safranina, registrada através de um espectrofluorímetro, em que o aumento da intensidade de fluorescência da safranina está relacionado à perda do potencial.

O potencial de membrana mitocondrial foi inicialmente avaliado para evidenciar no homogenato isolado de fígado de rato a presença de mitocôndrias íntegras. Para isso, ADP e oligomicina foram adicionados durante a espectrofluorimetria das mitocôndrias. Como pode ser observado na Figura 33, quando o ADP foi adicionado houve um pulso de cerca de 0,63 unidades de fluorescência (U.F.) entre os tempos de 5 e 7 minutos. Esse pulso de fluorescência é referente ao funcionamento da fosforilação oxidativa. O ADP estimula a ATP-sintase a transportar prótons para dentro da matriz, provocando uma leve diminuição do potencial eletroquímico. A adição consecutiva da oligomicina, inativa a ATP-sintase reestabelecendo o potencial de ação. Ambos os efeitos foram bem evidentes nos nossos estudos, confirmando que o homogenato isolado é constituído de mitocôndrias.

Figura 33 – Potencial de membrana mitocondrial no estado de repouso e ativo de fosforilação. MRF (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C contendo substrato para o complexo I (5 mM) e safranina (10 µM). A fosforilação foi induzida no estado ativo pela adição de ADP (250 µM) seguido de oligomicina (1 µg/mL). O CCCP (1 µM) foi adicionado após a estabilização do potencial. Gráfico representativo de n = 3. MITO = Mitocôndria, OLIGO = Oligomicina.



Fonte: AUTOR, 2016

Posteriormente, o efeito das diferentes concentrações de AuNRs foi avaliado frente ao potencial elétrico da membrana mitocondrial em presença de Ca^{2+} . Kowaltowski, Castilho e Vercesi (1995) reportaram que o cálcio fora capazes de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) causando a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A transição é caracterizada pela abertura de um poro não seletivo na membrana interna, tornando-a permeável à água, íons e outras moléculas. Dessa forma a adição de pequenas concentrações de cálcio é capaz de promover a entrada de prótons, reduzindo assim o potencial de membrana mitocondrial.

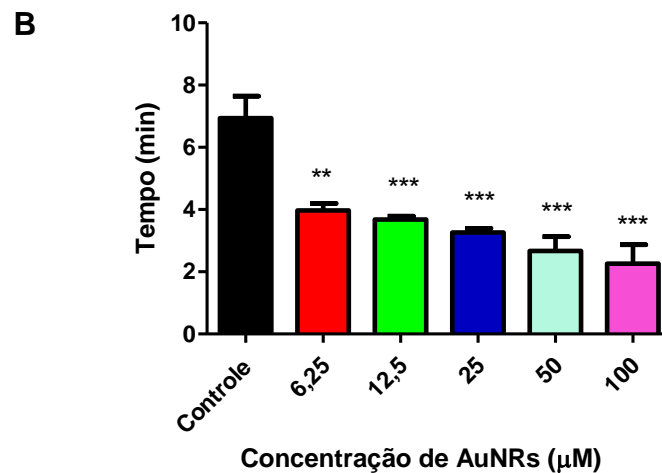
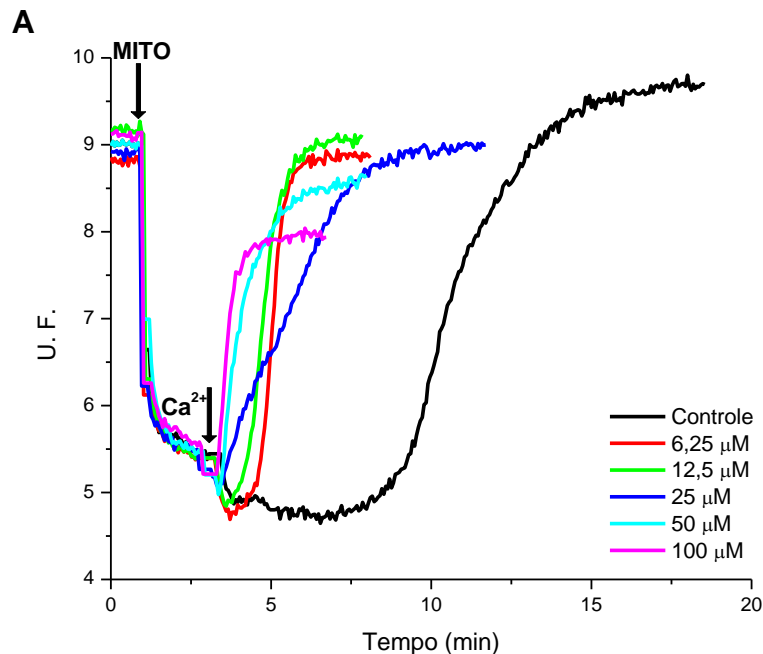
Em nossos estudos, os AuNRs induziram uma rápida dissipação do potencial elétrico de membrana mitocondrial em presença de Ca^{2+} de forma dose-dependente (Fig. 34A). É possível verificar na figura 36A que a curva referente ao controle (preto) começa a aumentar sua fluorescência muito mais tardiamente comparada as curvas onde há a presença de AuNRs.

O tempo inicial (min) onde ocorreu a perda do potencial (aumento da fluorescência) foi estimado para todos os grupos (Fig.34B): Controle 6,933 ($\pm 1,236$); 6,25 μM de AuNRs 3,972 ($\pm 0,381$); 12,5 μM de AuNRs 3,680 ($\pm 0,180$); 25 μM de AuNRs 3,265 ($\pm 0,229$); 50 μM de AuNRs 2,675 ($\pm 0,789$); 100 μM de AuNRs 2,260 ($\pm 1,052$). Como é possível evidenciar, os AuNRs aceleraram a perda do potencial em cerca de 54 %.

Esta rápida perda do potencial de membrana pode estar associada com a interação dos AuNRs pelos complexos da cadeia respiratória. Esses resultados sugerem que esta interação pode estar alterando a dinâmica de bombeamento de prótons que é essencial para a manutenção do potencial elétrico de membrana. Este resultado corrobora com o mecanismo proposto na avaliação da respiração mitocondrial (Anexo 1).

A interação dos AuNRs pelos complexos é capaz de interromper o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. A atenuação do transporte de elétrons pelos complexos diminui a sua capacidade de bombear prótons para o espaço intermembrana. A consequência deste fenômeno é a diminuição do gradiente de próton e do potencial elétrico de membrana.

Figura 34. AuNRs aceleram a dissipação do potencial de membrana mitocondrial induzido por Ca^{2+} . MFR (0,5 mg de proteína/mL) foram incubado em meio de reação padrão a 28 °C contendo substrato para o complexo I (5 mM) e safranina (10 μM) e Ca^{2+} (10 μM). Diferentes concentrações de AuNRs foram adicionadas. **Painel A.** Figura representativa de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Os AuNRs anteciparam a dissipação do potencial e forma dose-dependente. **Painel B.** Gráfico em barras representando a tangente dos traçados de potencial. As barras representam a média \pm S.D. (n = 3). $p < 0,05$ quando todos os grupos foram comparados ao controle de acordo com teste One-Way ANOVA e post hoc de Dunnett. MITO = Mitocôndria.



Fonte: AUTOR, 2016.

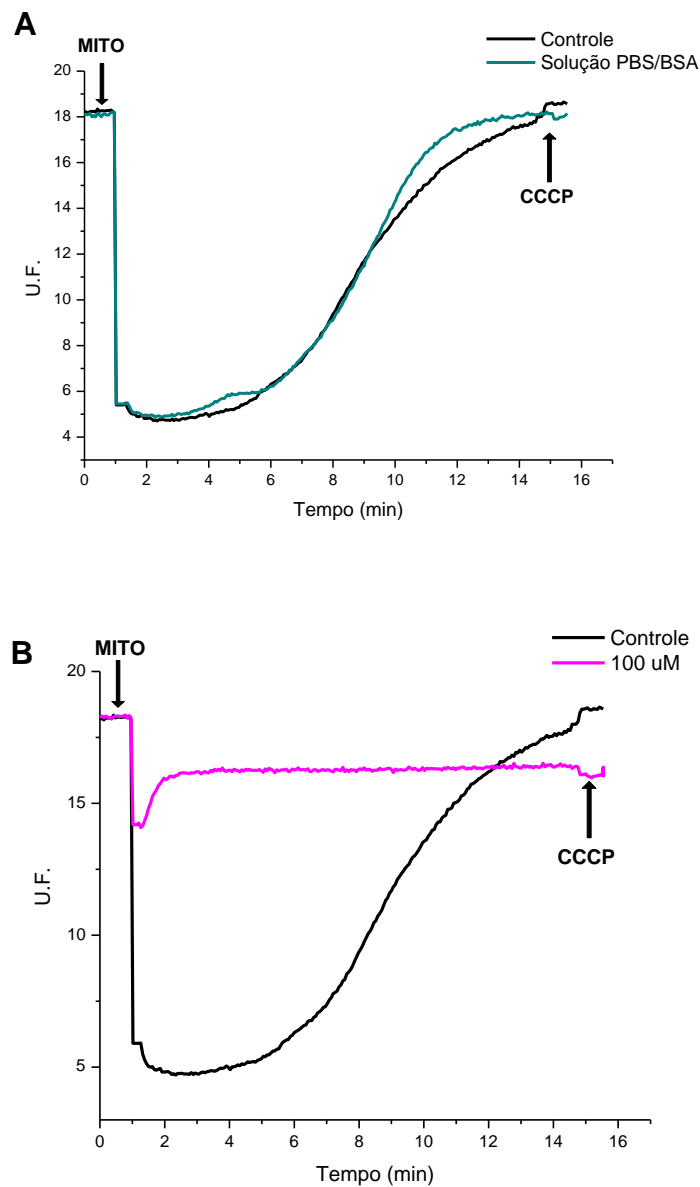
Vercesi et al. (2014) investigando o efeito da proteína Cramoll 1,4, uma lectina extraída da semente da *Cratylia mollis Mart* com atividade imunomodulatória, sob mitocôndrias de fígado de rato, tiveram um resultado semelhante ao nosso. Em presença de 30 μM de Ca^{2+} , a lectina Cramoll 1,4 foi capaz de induzir a dissipação do potencial de membrana mitocondrial. Vercesi et al. (2013) também demonstraram que a sinvastatina pode induzir a dissipação do potencial no mesmo modelo experimental.

Com o objetivo de verificar se o efeito dissipador do potencial elétrico de membrana mitocondrial é intrínseco das nanopartículas, avaliamos o potencial de membrana do coloide com maior concentração de AuNRs (100 μM) e somente da solução meio sem as nanopartículas (Fig. 35).

O gráfico referente ao meio de dispersão dos AuNRs apresentou um comportamento semelhante ao controle (Fig. 35A), com a formação de um pequeno pulso de fluorescência em 5 minutos. Quando comparamos esse resultado com a drástica dissipação do potencial com o seu correspondente em presença de AuNRs (Fig. 35B), percebemos que são as nanopartículas as protagonistas do fenômeno de dissipação do potencial, neste experimento.

Os estudos sobre o potencial de membrana mitocondrial revelaram que os AuNRs estimulam a dissipação potencial na presença de Ca^{2+} . Estes resultados corroboram com os demais e retifica que se trata de um efeito específico da nanopartícula e não do ambiente em que está dispersa.

Figura 35 – Efeito da solução tampão fosfato com BSA (PBS/BSA) no potencial de membrana mitocondrial. MFR (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C contendo substrato para o complexo I (5 mM) e safranina (10 μ M). A fosforilação foi induzida no estado ativo pela adição de ADP (250 μ M) seguido de oligomicina (1 μ g/mL). O CCCP (1 μ M) foi adicionado após a estabilização do potencial. **Painel A:** Gráfico demonstrando o efeito da solução PBS/BSA no potencial. A solução PBS/BSA não causou efeitos significativos na dissipação do potencial. **Painel B:** Gráfico demonstrando o efeito dos AuNRs na maior concentração correspondente ao volume utilizado no Painel A. Ambas figuras são representativas de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.



Fonte: AUTOR, 2016.

6.6 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O estresse oxidativo envolve o aumento na formação de ânio superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^-), entre outros, genericamente chamados de espécies reativas de oxigênio (EROS) (KOWALTOWSKI et al. 1996). Esse fenômeno gera um desbalanço entre a formação excessiva de EROS e o limitado mecanismo antioxidante, geralmente associado às condições deletérias. As EROS geradas na mitocôndria podem promover a transição de permeabilidade mitocôndrial (TPM), aumentando a permeabilidade da membrana interna e induzindo a célula a um processo de morte.

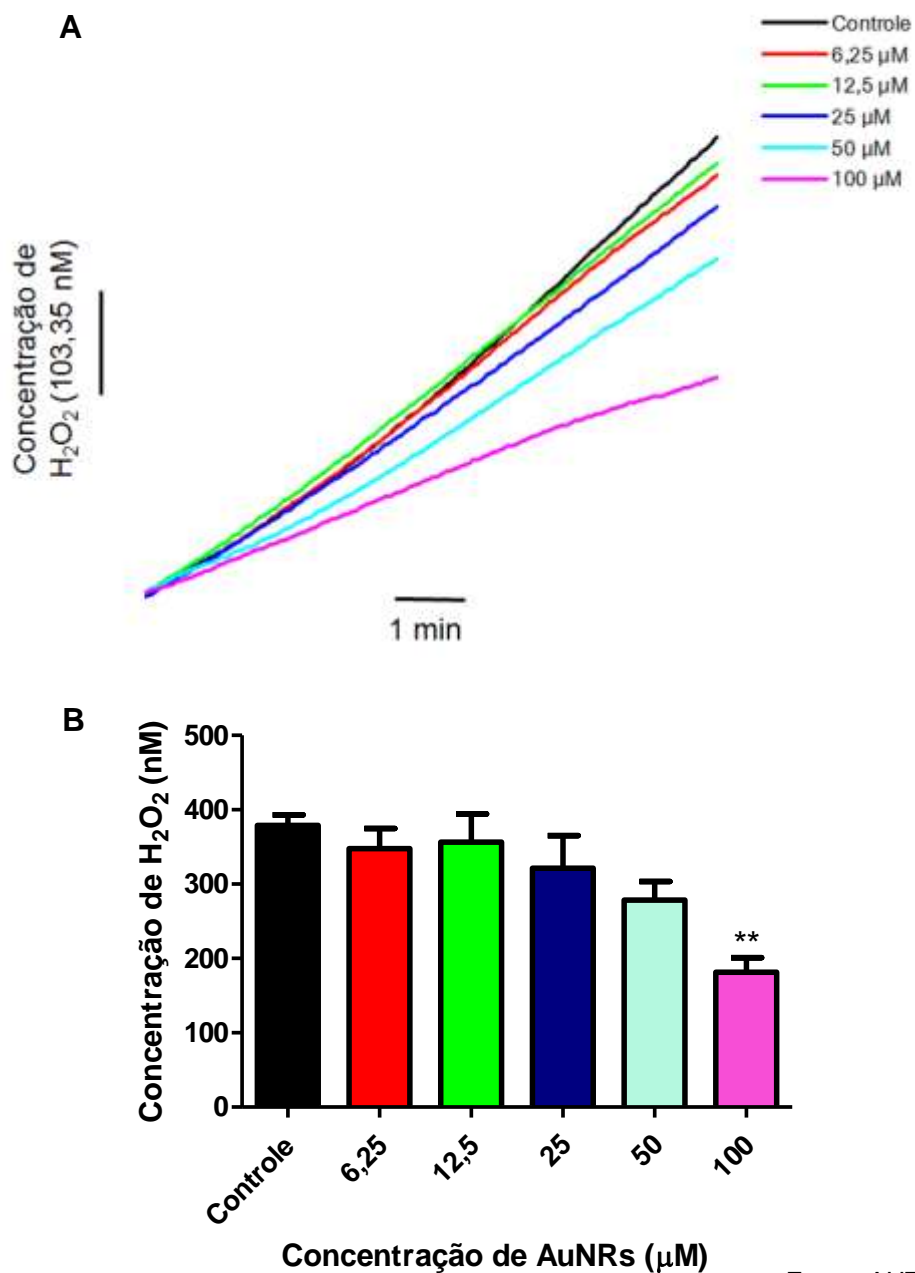
Portanto, a avaliação da geração de EROS mitocondriais é uma ferramenta muito útil na determinação da integridade mitocondrial. Neste trabalho, foram realizadas duas metodologias para a avaliação da influência dos AuNRs na produção de EROS. Na primeira foi utilizado um probe específico para H_2O_2 , o Amplex-Red. Na segunda foi utilizado um probe inespecífico, apto a detectar a produção de outras EROS, o H_2DCFDA .

6.6.1 EROS (AMPLEX-RED):

A produção de H_2O_2 mitocondrial foi monitorada quando as mitocôndrias foram expostas à concentrações variadas de AuNRs (6,25 – 100 μM). Ao contrário do que se esperava, a presença das nanopartículas provocou uma diminuição na produção de H_2O_2 . Como é possível observar na Figura 36A, a maior produção de H_2O_2 foi encontrada para no controle na ausência de AuNRs (gráfico preto). À medida que a concentração de AuNRs aumenta, a produção de peróxido de hidrogênio tende a diminuir. No gráfico em barras, Figura 36B, é possível observar a produção de H_2O_2 em valores reais de concentração (nM), contudo a geração deste diminui com o aumento de AuNRs no meio. Embora apenas o grupo de maior concentração (100 μM) foi considerado estatisticamente significativo.

Essa diminuição pode estar relacionada à interação dos AuNRs pelos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Essa interação parece ser capaz de influenciar a cascata de oxirreduções, interrompendo o fluxo de elétrons entre os complexos e, por fim, à redução do O_2 , (Anexo 1).

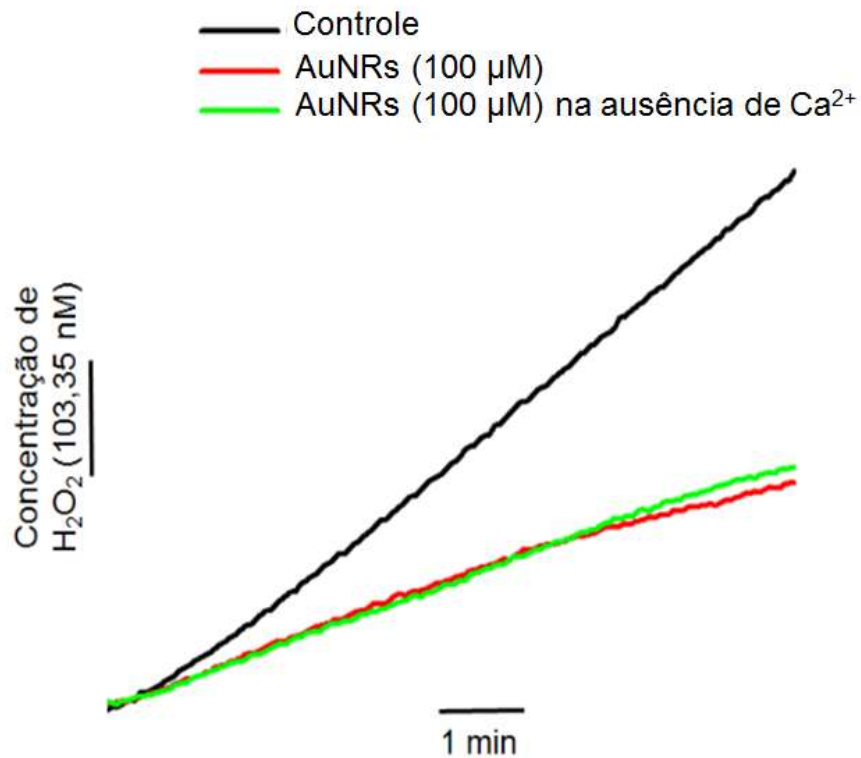
Figura 36 – Produção de H₂O₂ por mitocôndrias de fígado na presença ou não de AuNRs. MFR (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C contendo substrato para o complexo I (5 mM), Amplex Red® (10 µM) e HRP (1 U/mL). **Painel A:** Traçado representativo da média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata na ausência ou presença de AuNRs. AuNRs causaram diminuição na produção de H₂O₂. **Painel B:** Produção de H₂O₂ na presença ou não de AuNRs. As barras representam a média ± S.D. (n = 3) com tratamento estatístico One-Way ANOVA e post hoc de Dunnett com p < 0,05.



Fonte: AUTOR, 2016.

Para verificar a influência do Ca^{2+} na produção de EROS, foi realizado um experimento com a maior concentração de AuNRs ($100 \mu\text{M}$) em presença de EGTA. Na figura 37 podemos verificar a sobreposição entre os traços de AuNRs na presença e na ausência de EGTA, verde e vermelho, respectivamente.

Figura 37 – Nanobastões de ouro induzem diminuição na produção de H_2O_2 na ausência de Ca^{2+} . Na concentração de $100 \mu\text{M}$, os AuNRs diminuíram a produção de H_2O_2 na mesma proporção, tanto na presença, como na ausência de Cálcio. MFR ($0,5 \text{ mg de proteína/mL}$) foram incubadas em meio de reação padrão a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ contendo substrato para o complexo I (5 mM), Amplex Red® ($10 \mu\text{M}$) e HRP (1 U/mL). Para o traçado na ausência de Ca^{2+} , foi adicionado EGTA a $200 \mu\text{M}$. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

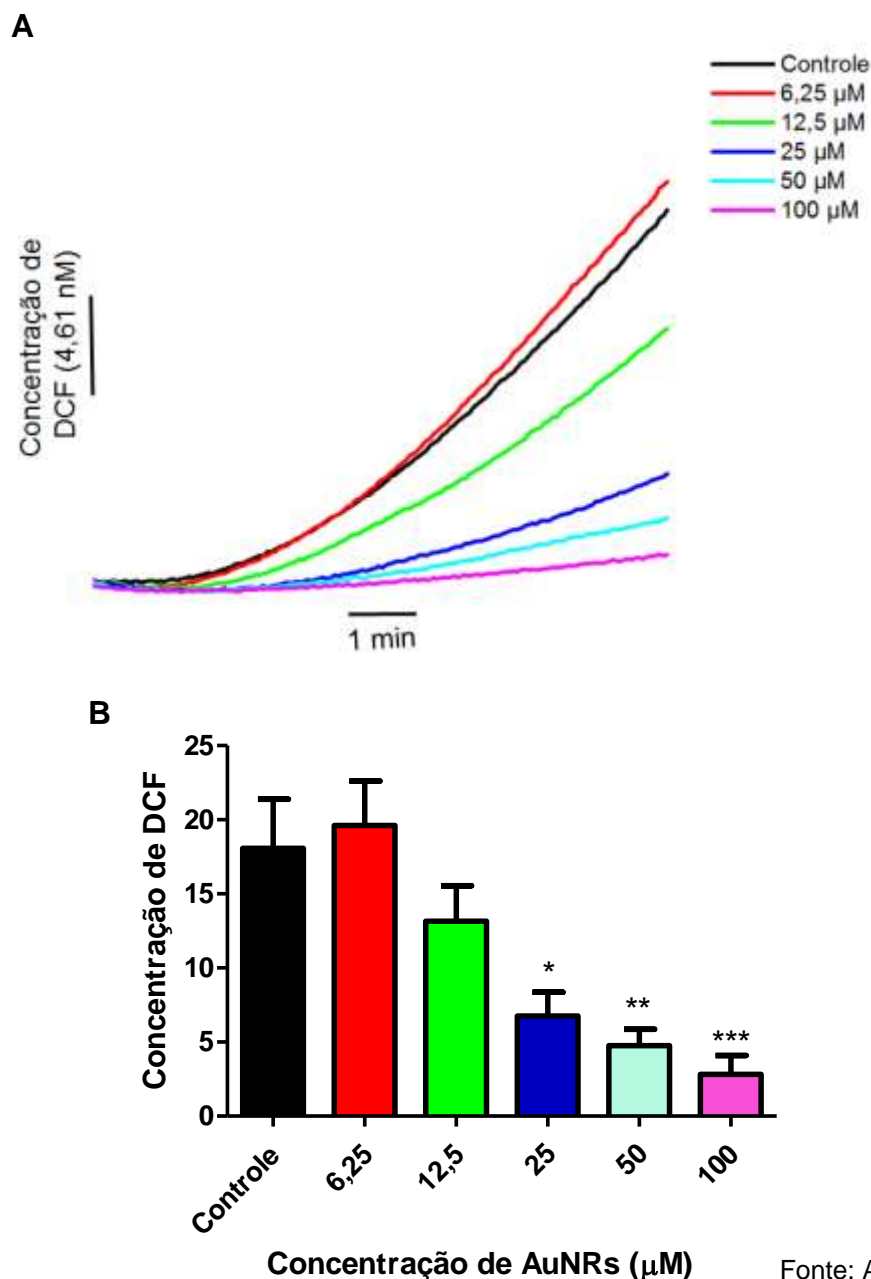


É possível evidenciar que a presença de cálcio não influencia a produção de EROS quando a mitocôndria está na presença de AuNRs. Esse resultado revela que os AuNRs podem atuar na mitocôndria por um mecanismo independente de cálcio. Acredita-se que a interação entre as nanopartículas e os complexos da cadeia respiratória seja capazes de interromper ou diminuir o fluxo de elétrons, o que resulta na diminuição do consumo de oxigênio, como já demonstrado nos experimentos de respiração, e diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio.

6.6.2 EROS (H₂DCFDA):

Quando o H₂DCF, um probe inespecífico para EROS foi utilizado, o mesmo resultado foi encontrado, ou seja, a produção de EROS decresce a medida que a concentração de AuNRs aumenta (Fig. 38A). Neste caso, a concentração de 6,25 µM de AuNRs apresentou um comportamento semelhante ao controle, com uma produção ligeiramente maior de EROS (Fig. 38B).

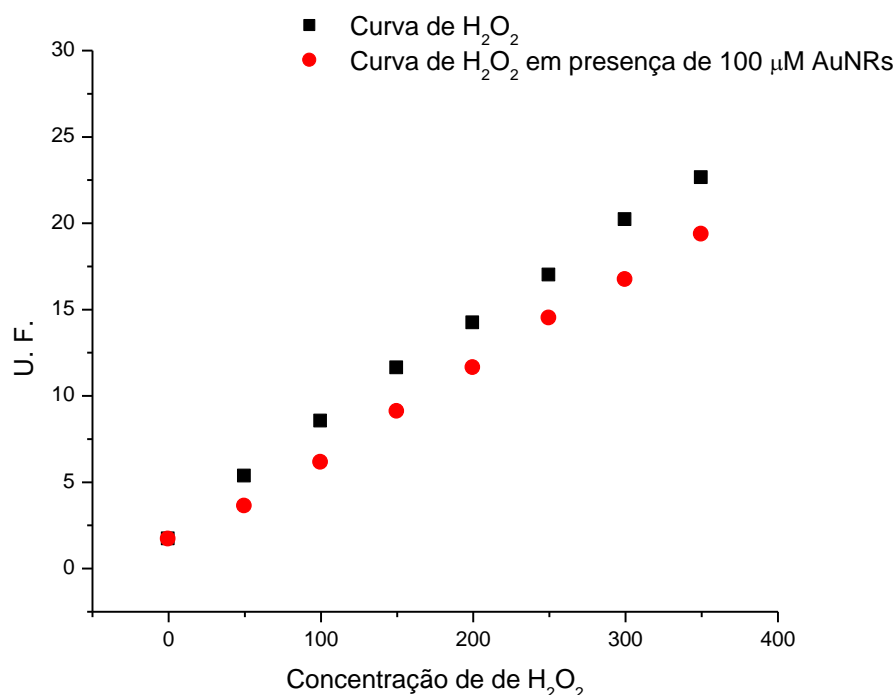
Figura 38 – Medida da geração de espécies reativas de oxigênio via oxidação de H₂DCFDA por mitocôndrias isoladas na presença de AuNRs em diferentes concentrações. MFR (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C contendo substratos para o complexo I (5 mM) e H₂DCFDA (1 μM). **Painel A:** Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. AuNRs provocaram redução da geração de EROS de forma dose-dependente. **Painel B:** Produção de EROS na presença ou não de AuNRs. As barras representam a média ± S.D. (n=3) com tratamento estatístico One-Way ANOVA e post hoc de Dunnett com $p < 0,05$.



Fonte: AUTOR, 2016.

Ambos os probes demonstraram que a presença de AuNRs induziu um efeito “protetor” sob a produção de EROS. A princípio, o mecanismo depressor de EROS parece estar relacionado à interação AuNRs-complexos respiratórios. Todavia, nanopartículas de ouro são amplamente utilizadas como catalisadores de diversas reações, incluindo reações de oxirredução. Possivelmente, os AuNRs podem estar catalisando a redução do H_2O_2 a H_2O , atuando como agentes antioxidantes (CAO et al. 2010). A fim de investigar mais acerca deste efeito, realizamos uma curva de calibração de H_2O_2 na presença e ausência de AuNRs (Fig. 39).

Figura 39 – Interação de nanobastões de ouro com o H_2O_2 . AuNRs na concentração de $100\ \mu\text{M}$ foram acrescentados ao meio de reação padrão com a adição de vários pulsos de $50\ \text{nM}$ de H_2O_2 . AuNRs foram capazes causar um desvio negativo no perfil da curva de concentração de H_2O_2 . Gráfico representativo de 3 experimentos independentes.



Fonte: AUTOR, 2016.

A variação entre os pontos da curva de concentração de H_2O_2 nestas duas condições é evidente (Fig. 39). A medida que a concentração de H_2O_2 aumenta o

desvio da condição padrão tende a aumentar. A maior concentração de H₂O₂ utilizada neste experimento (350 nM) mostrou uma queda de 14%. Esse resultado sugere que os AuNRs são capazes de acelerar a conversão do peróxido de hidrogênio. Cao, Li e Jv (2010) observaram que nanopartículas de ouro possuem uma atividade peroxidase intrínseca, podendo ser aplicadas em ensaios colorimétricos de detecção de H₂O₂.

Os estudos de produção de EROS resultaram em uma tendência contrária à maiorias das drogas de ação mitocondrial. Os AuNRs diminuíram a formação de EROS mitocondriais de forma dose-dependente. Adicionalmente não houve variação significativa na produção de H₂O₂ em presença de EGTA, o que reforça os resultados de potencial elétrico de membrana, indicando que o mecanismo parece ser pouco dependente de Ca²⁺. Esses estudos também revelaram um efeito “antioxidante” dos AuNRs (Anexo 1).

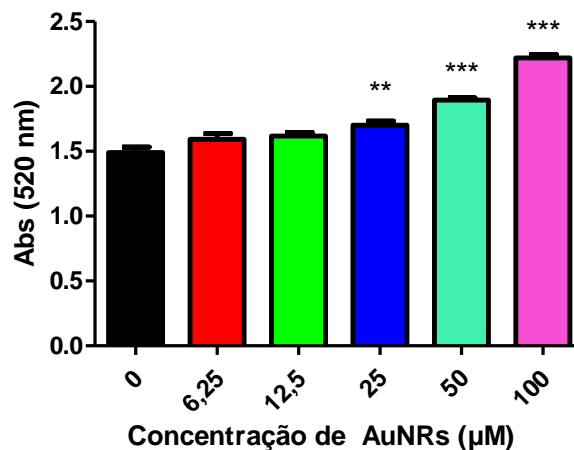
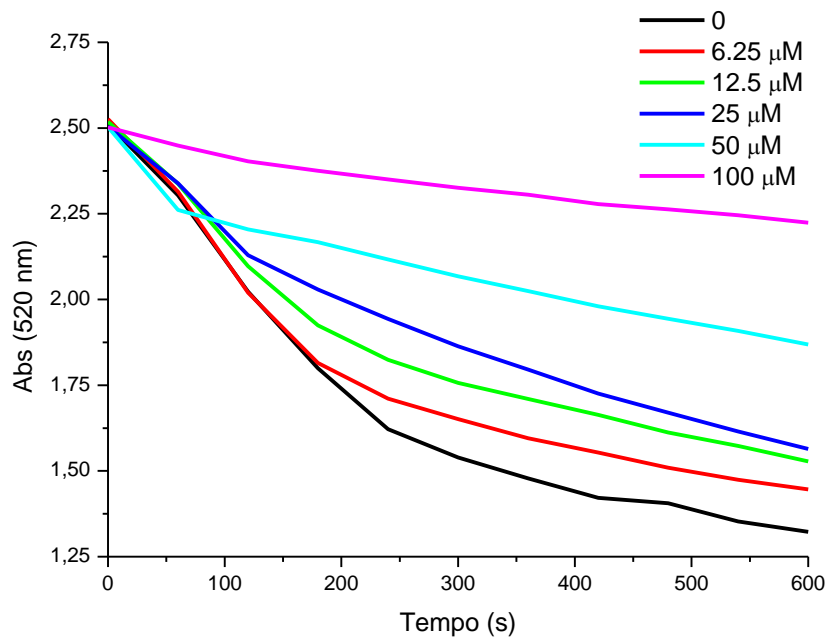
6.7 INCHAMENTO MITOCONDRIAL:

A permeabilização progressiva associada a altas concentrações de Ca²⁺ e EROS na matriz mitocondrial, provoca o aumento do volume da mitocôndria, um fenômeno conhecido com inchamento mitocondrial. O inchamento ocorre quando as EROS oxidam os grupamentos tióis do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, provocando sua abertura e tornando possível a internalização de água, íons e outras moléculas (< 1,5 kDa) (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 1996).

Sendo assim, o inchamento pode ser uma medida indireta da consequência da produção de EROS. Conforme pode ser visto na figura 40A, a adição de AuNRs foi capaz de atrasar o inchamento mitocondrial. A curva controle (preto) apresentou a mais rápida queda na absorbância, quando comparada as demais. O inchamento é caracterizado neste experimento pela perda da absorbância.

No gráfico em barras da Figura 40B é possível evidenciar o aumento da absorbância em função da concentração de AuNRs. Sendo a absorbância uma variável inversamente proporcional ao inchamento, o aumento de AuNRs, neste estudo, promove a diminuição do inchamento mitocondrial.

Figura 40 – Redução do inchamento mitocondrial induzido por nanobastões de ouro em presença de Ca^{2+} . Mitocôndrias (0,5 mg de proteína) foram incubadas em meio de reação padrão contendo substrato para o complexo I (5mM) e Ca^{2+} (10 nM). **Painel A:** Figura representativa de 3 experimentos independentes. Os AuNRs causaram uma redução significativa do inchamento mitocondrial. **Painel B:** Absorbância relativa das mitocôndrias frente a diferentes concentrações de AuNRs. As barras representam a média \pm D.P. (n=3) com tratamento estatístico One-Way ANOVA e post hoc de Dunnett com $p < 0,05$.



Fonte: AUTOR, 2016.

O mesmo resultado foi obtido por Kowaltowski, Netto e Vercesi (1998) quando avaliaram a atividade mitocondrial das enzimas antioxidantes tiól-específicas e da catalase, enzima responsável pela decomposição do H_2O_2 . Essas enzimas causaram redução do inchamento mitocondrial de uma forma semelhante aos AuNRs.

O lento inchamento mitocondrial em presença de AuNRs provavelmente é reflexo da diminuição de EROS produzidos na mitocôndria. No estudo anterior foi evidenciado que os AuNRs provocaram uma diminuição na produção de EROS. A baixa concentração de EROS na matriz reduz a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, logo o inchamento também é prolongado.

6.8 ESTUDOS COM UM INIBIDOR DA TPM

Com o propósito de reafirmar que a perda da integridade mitocondrial verificada pela rápida dissipação do potencial de membrana mitocondrial induzida pelos AuNRs ocorre via interação com os complexos e eliminar a possibilidade do potencial estar sendo liberado pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) foi realizado um estudo de potencial e inchamento na presença de ciclosporina A (CsA), um inibidor do PTPM.

Conforme pode ser visto na figura 41, mesmo na presença de CsA, os AuNRs na maior concentração (100 μM) foram capazes de promover a rápida dissipação do potencial de membrana. Este resultado sugere que esta perda do potencial elétrico ocorre independente da abertura do PTPM.

Em consonância com estes estudos, foi realizada a monitoração do inchamento mitocondrial na presença de CsA (Fig. 42). O efeito dos AuNRs no inchamento ocorre de forma similar seja na presença ou ausência de CsA, corroborando com a ideia de que a ação dessas partículas ocorre via interação com os complexos.

Figura 41 – Efeito da CsA sobre a ação dos AuNRs no potencial elétrico de membrana mitocondrial. MFR (0,5 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C contendo substrato para o complexo I (5 mM) e safranina (10 μ M) e Cálcio (10 μ M). AuNRs foram adicionados na concentração de 100 μ M na presença e ausência de CsA. O CCCP (1 μ M) foi adicionado após a estabilização do potencial. A figura é representativa de 5 experimentos independentes realizados em duplicata

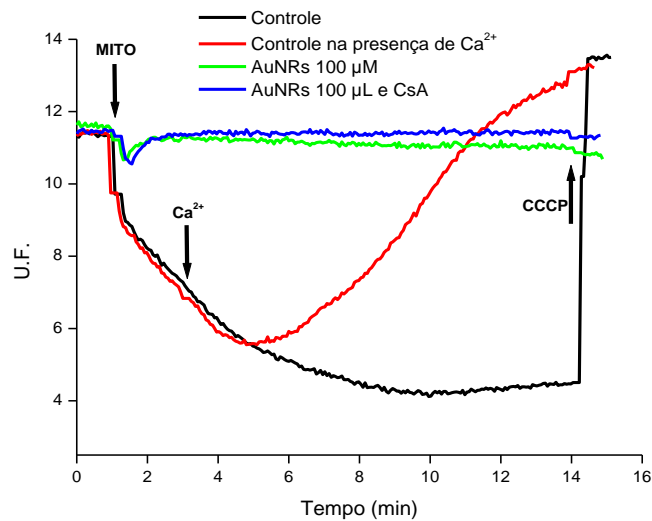
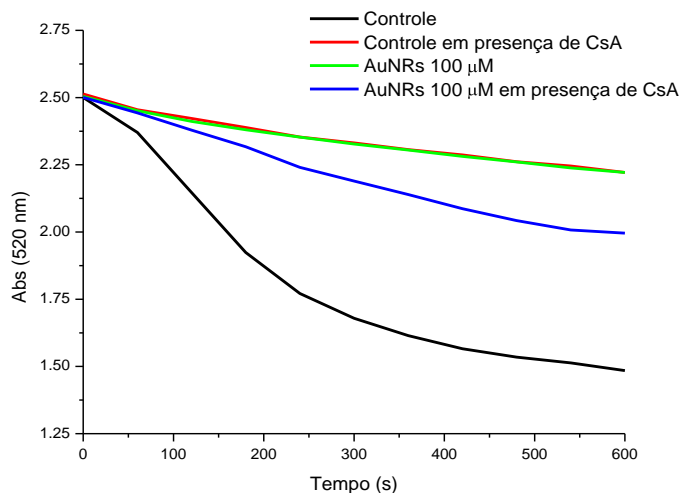


Figura 42 – Efeito da CsA sobre a ação do AuNRs na indução do inchamento mitocondrial. Mitocôndrias (0,5 mg de proteína) foram incubadas em meio de reação padrão contendo substrato para o complexo I (5mM) e Ca^{2+} (10 nM). Figura representativa de 3 experimentos independentes.

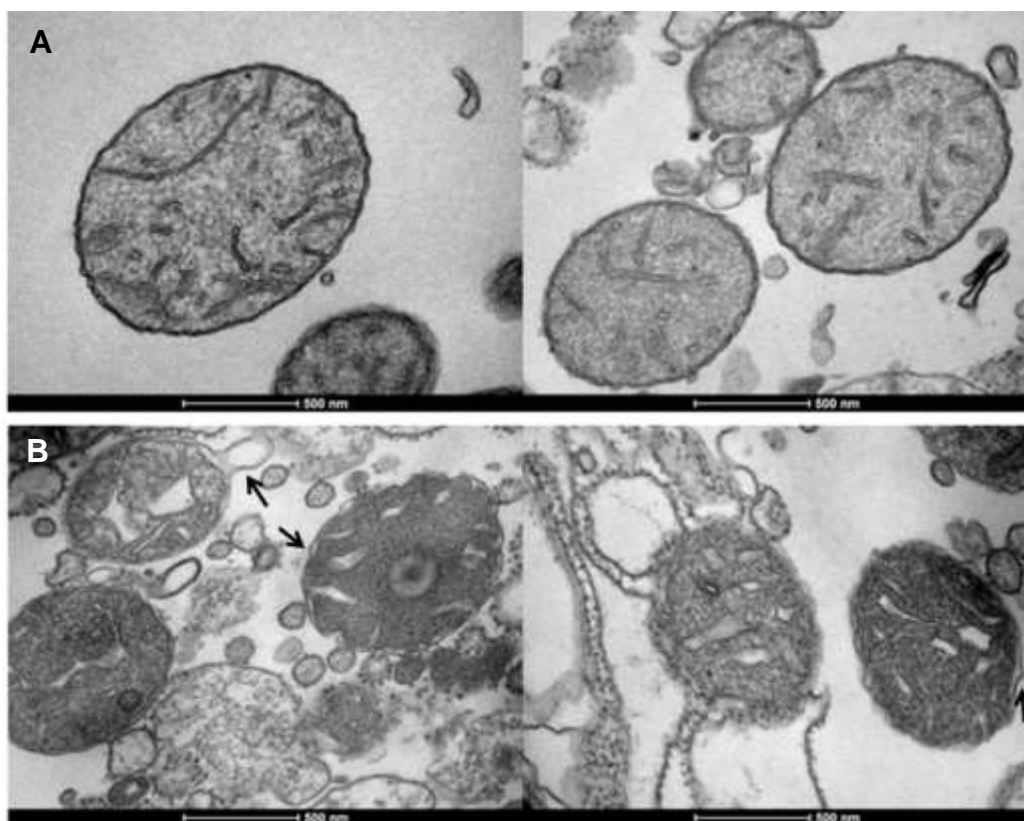


6.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE MITOCÔNDRIAS NA PRESENÇA DE AUNRS

A influência dos AuNRs sobre a curva de H_2O_2 nos levou a identificar seu efeito “antioxidante” sobre as EROS produzidas na cadeia transportadora de elétrons. Todavia, essa hipótese ainda não exclui o mecanismo anteriormente proposto: que a diminuição das EROS ocorre em virtude da interrupção do fluxo de elétrons em decorrência da interação entre AuNRs e complexos. Um fator determinante desse mecanismo é a localização espacial destas partículas no sistema mitocondrial.

Buscou-se avaliar esse fator através da caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Fig. 43). Na preparação da amostra, são realizadas sucessivas lavagens (10 lavagens) para promover a fixação e o seu contraste. Em nosso estudo, avaliamos apenas a maior concentração (100 μM) e o controle.

Figura 43 – Influência de AuNRs na morfologia de mitocôndrias isoladas por imagens de microscopia de transmissão. Imagens representativas de mitocôndrias (A) controles e (B) com tratamento de nanobastões de ouro a 100 μM . Escala de 500 nm



Fonte: AUTOR, 2016.

Em nenhuma imagem foi observada a presença de AuNRs, provavelmente decorrente da lavagem. Esse é um indício de que os AuNRs devem estar interagindo com a mitocôndria apenas na face externa. Essa provável localização dos AuNRs sugere que a redução das EROS ocorra, em maior parte, pela ação das nanopartículas sobre os complexos multienzimáticos da cadeia transportadora de elétrons. O seu efeito antioxidante deve ser levado em conta, porém a permeabilidade seletiva da membrana interna da mitocôndria impede que as espécies reativas sejam eliminadas da matriz, pelo menos no primeiro momento do insulto (Anexo 1).

Embora os AuNRs não tenham sido observados nas imagens MET, os seus efeitos na morfologia das mitocôndrias foram significativos. As mitocôndrias tratadas com AuNRs apresentaram um padrão desorganizado de cristas (Fig. 43B) comparado ao controle (Fig. 43A). Um descolamento intermembranar também foi observado nas mitocôndrias tratadas com AuNRs (Fig. 43 - setas pretas).

Outros estudos avaliando a influência de metais, não necessariamente nanoparticulados, em mitocôndrias isoladas, obtiveram imagens semelhantes. Cambier et al. (2009) observaram que o metilmercúrio (MeHg) foi capaz de provocar um desarranjo nas cristas mitocondrias de mitocôndrias de músculo de zebra fish. De Oliveira et al. (2007) utilizaram o termo “perda na arquitetura das cristas” para descrever o efeito do MeHg no mesmo modelo biológico.

Adicionalmente, o tamanho médio das mitocôndrias identificadas nas imagens de MET foi calculado para ambos os grupos, controle e AuNRs 100 μM . As mitocôndrias tratadas com AuNRs apresentaram um diâmetro médio inferior ao controle (Tabela 5). Este resultado corrobora com o inchamento mitocondrial, no qual as mitocôndrias tratadas com nanopartículas passaram por um processo de inchamento mais lento. Contudo, a análise estatística do tamanho da mitocôndria por MET é apenas sugestiva, pois as micrografias são realizadas em uma secção do homogenato.

Tabela 5 – Diâmetro médio de mitocôndrias isoladas em presença ou não de AuNRs calculado através das imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Tabela representando o diâmetro médio das mitocôndrias encontradas nas imagens na condição controle e na presença de AuNRs a 100 µm. Total de 100 mitocôndrias foram medidas, $p < 0,05$, Test t Student.

Amostra	Média (nm)	Desvio Padrão
Controle	862	± 30
100 µM AuNRs	740*	± 36

*estatisticamente significativo. *Test t Student*

Fonte: AUTOR, 2016.

Essa pesquisa tem nos direcionado a um possível mecanismo de ação para os nanobastões de ouro como um potencial agente antitumoral. Com a elucidação do seu mecanismo, novos fármacos com ação antitumoral na mitocôndria podem ser ancorados sobre a nanopartícula potencializando ainda mais seus efeitos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Nanobastões de ouro com um alto grau de seletividade (90%) e razão C/L de 3,7 foram obtidos a partir do método mediado por semente. O tratamento com albumina sérica bovina promoveu o deslocamento batocrômico da banda de plásmon de superfície longitudinal em 20 nm, sendo um indício da ancoragem dessa proteína nos nanobastões. A adição da BSA não promoveu modificações significativas na morfologia das partículas caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e dispersão dinâmica da luz.

Os estudos do efeito dos nanobastões de ouro em mitocôndrias isoladas de fígado de rato já sinalizam um possível mecanismo para ação antitumoral dos nanobastões de ouro sobre as mitocôndrias. A ação dos AuNRs na respiração e no potencial elétrico mitocondrial indicam uma forte interação com os complexos da cadeia transportadora de elétrons. A diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio em presença de AuNRs sugere também que o fluxo de elétrons entre os complexos está sendo interrompido, minimizando a formação de O_2^- , H_2O_2 ou OH^\cdot . A redução do inchamento mitocondrial e a ausência dos AuNRs no interior das mitocôndrias corroboram com a hipótese descrita. As imagens de MET também apontaram que na maior concentração de estudo (100 μM), os nanobastões provocaram desorganização das cristas mitocondriais e descolamento das membranas. Os experimentos realizados em presença de EGTA demonstraram que a perda da integridade mitocondrial parece ser pouco dependente de Ca^{2+} .

A elucidação da forma de atuação dos nanobastões de ouro na mitocôndria foi o primeiro passo no entendimento do seu mecanismo de ação no ambiente celular. Contudo, mais estudos precisam ser realizados a fim de entender a sua dinâmica no organismo vivo, visando a sua utilização como potencial agente antitumoral.

Perspectivas:

- Otimizar os processos de lavagens na preparação das amostras para microscopia – a fim de observar a presença dos AuNRs nas micrografias;
- Avaliar o efeito dos nanobastões de ouro em fígado permeabilizado – possibilitando o estudo do seu tráfego intracelular;
- Avaliar o efeito dos nanobastões de ouro em animais tratados – realizando novos testes de bioenergética mitocondrial para elucidar os seus efeitos tóxicos;
- Avaliação do efeito dos nanobastões de ouro em diferentes linhagens celulares – com a finalidade de confirmar o efeito antitumoral seletivo;
- Ancorar drogas antitumorais com ação antitumoral – aproveitando do efeito seletivo dos AuNRs para potencializar sua ação com a ancoragem de drogas (estatinas) com potencial efeito antitumoral;
- Propor um protótipo de tratamento com base nanobiotecnológica para o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AIKEN III, J. D.; FINKE, R.G. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Colorado, EUA, v. 145, p. 1-44, 1999
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3. Ed. Editora Artmed, 2011
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Editora Artmed, 2010
- ALKILANY, A. M.; THOMPSON, L. B.; BOULOS, S. P.; SISCO, P. N.; MURPHY, C. J. Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, 190-199, 2012
- ANDREOLLO, N.A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012
- AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Graduação (Monografia em química) – UNICAMP, São Paulo, 2002
- BARNGROVER, B.M.; AIKENS, C.M. Oxidation of gold clusters by thiols. **The Journal of Physical Chemistry**, EUA, v. 117, n. 25, p. 5377-5384, 2013
- BERNARDES, C. F.; MEYERFERNANDES, J. R.; BASSERES, D. S.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Ca²⁺-dependent permeabilization of the inner mitochondrial-membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1188, p. 93-100, 1994
- BISWAS, A.; BAYES, I.S.; BIRIS, A.S.; WANG, T.; DERVISHI, E.; FAUPEL, F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques, applications & future prospects. **Advances in colloid and interface science**, Kiel, Germany, v. 170, p. 2-27, 2012.
- BOHREN, C.F.; HUFFMAN, D.R. **Absorption and scattering of light by small particles**. New York: Wiley-Interscience, 1983, 529 páginas
- BONIFÁCIO, L.S. **Processos de agregação e fusão de nanopartículas de ouro: uma abordagem química**. Mestrado (Mestrado em química) – USP, São Paulo, 2006.
- BOULEVARD, W. Nanotechnology: big thing from a tiny world. **National Nanotechnology Initiative**, Stafford, 2008.
- BOURDINEAUD, J; ROSSIGNOL, R.; BRETHERS, D. Zebrafish: a model animal for analyzing the impact of environmental pollutants on muscle and brain mitochondrial

bioenergetics. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 1, p. 16-22, 2013

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADY, L.W.; PEREZ, C.A.; HALPERIN, E.C. **Perez and Brady's: Principles and practice of radiation oncology**. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008

BRÉCHIGNAC, C.; HOUDY, P.; LAHMANI, M. **Nanomaterials and Nanochemistry**. Paris: Éditions Belin, 2007.

BRDICZKA, D.; BEUTNER, G.; RUCK, A.; DOLDER, M.; WALLIMANN, T. The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. **Biofactors**, v. 8, p. 235-242, 1998

BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBORTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** v. 287, p. 817-833, 2004.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. 1821 páginas

BRUST, M. et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticle in two-phase liquid-liquid system. **Journal of Chemical Society**, Liverpool, UK, p. 801-802, 1994

BYRNE, A.M.; LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L. Contribution of increased mitochondrial free Ca^{2+} to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. **Hepatology**. v. 29, p. 1523-1531, 1999

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**. v. 84, p. 277-359, 2004

CAMBIER, S. et al. At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 4, p. 791-799, 2009

CAMPBELL, M.K.; **Bioquímica**. 8 ed. Artmed, 2013

Cancer. **World Health Organization**, 2012

CAREW, J.S.; HUANG, P. Mitochondrial defects in cancer. **Molecular cancer**, v. 1, n. 1, p. 1, 2002

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature**, v. 175, p. 1120-1121, 1955.

CHEN, C. et al. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 926-932, 2007

CHEN, Z.; ZHANG, H.; LU, W.; HUANG, P. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 553-560, 2009

COLONNA, R. et al. The problem of cation-binding sites in the energized membrane of intact mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 577-385, 1973

COSTA, R.A.P. et al. Protective effects of L-carnitine and piracetam against mitochondrial permeability transition and PC3 cell necrosis induced by simvastatin. **European journal of pharmacology**, v. 701, n. 1, p. 82-86, 2013

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochemical Journal**, v. 341, p. 233-249, 1999

CULLEN, K. J.; YANG, Z. J.; SCHUMAKER, L.; GUO, Z. M. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 43-50, 2007

Da SILVA, M.G.A.; NUNES, A.M.; MENEGHETTI, S.M.P; MENEGHETTI, M.R. New aspects of gold nanorod formation via seed-mediated method. **Comptes Rendus Chimie**, Maceió, Alagoas, v. 15, n. 7, p. 640-650, 2013

Da SILVA, M.G.A. **Síntese, dinâmica de formação, caracterização e propriedades ópticas de nanobastões de ouro dispersos em meio aquoso e matrizes orgânicas**. Mestrado (mestrando em química) Maceió - UFAL, Alagoas, 2014

DAVIS, M.E.; ZUCKERMAN, J.E.; CHOI, C.H.J.; SELIGSON, D.; TOLCHER, A.; ALABI, C.A.; YEN, Y.; HEIDEL, J.D.; RIBAS, A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via target nanoparticles. **Nature**, v. 464, p. 1067-1070, 2010

DEY, S.; SIDOR, A.; O'ROURKE, B. Compartment-specific Control of Reactive Oxygen Species Scavenging by Antioxidant Pathway Enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, 291, 21, 11185 - 11197, 2016

DONG, G.; MAO, Q.; XIA, W.; XU, Y.; WANG, J.; XU, L.; JIANG, F. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis (Review). **Oncology Letters**, 11, 1980-1986, 2016

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; TEIXEIRA, Z. **Nanotecnologia e nanobiotecnologia: conceitos básicos**. 2007. Graduação (Química) – Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, 2007.

EDELSTEIN, A. S.; CAMMARATA, R.C.; **Nanomaterials: synthesis, properties and applications**. Baltimore (United States of America): Taylor & Francis, 1996. 616 páginas.

ELIM, H.I.; YANG, J.; LEE, J. Observation of saturable and reverse-saturable absorption at longitudinal surface plasmon resonance in gold nanorods. **Applied Physics Letters**, Singapura, v. 88, n. 8, p. 083107, 2006

ESTABROOK, R. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. **Methods in Enzymology**, v. 10, p. 41-47, 1967

ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: **INCA**, 2016

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, p. 342-348, 2001

FAGIAN, M. M.; PEREIRADASILVA, L.; MARTINS, I. S; VERCESI, A. E. Membraneprotein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial-membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 19955-19960, 1990

FELDHEIM, D.L.; FOSS JR, C.A. **Metal nanoparticles: synthesis, characterization and applications**. New York: Marcel Dekker, 2001

FERNANDES, M.P. et al. The Cratylia mollis Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Trypanosoma cruzi Mitochondria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 381-388, 2014

FIGUEIRA, T. R., MELO, D. R. et al. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. **Methods Mol Biol**, v.810, p.103-17, 2012

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C. B.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, p. 2029-2074, 2013

GALEMBECK, F.; SÁ, G.F.; CHAVES, A.; COSTA, D.A.L.; SILVA, E.F. Desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia. **Portaria MCT nº 252** 2003, 16 de maio

GOLE, A; MURPHY, C.J. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 19, p. 3633-3640, 2004

- GOWING, L.R.; ALI, R.L.; ALLSOP, S.; MARSDEN, J.; TURF, E.E.; WEST, R.; WITTON, J. Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report. **Addiction**, v. 110, p. 904-919, 2015
- GRZELCZAK, M.; PÉREZ-JUSTE, J.; MULVANEY, P.; LIZ-MARZÁN, L. M.; Shape control in gold nanoparticle synthesis. **Chemical Society Reviews**, Vigo, Espanha, v. 37, p. 1783-1791, 2008.
- HALL, J. E. **Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed., Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2011
- HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física**. Editora LTC, v. 1, 8 ed., 2009, 356 páginas
- HAN, G. et al. Gold nanoparticle in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Massachusetts, v. 60, n. 11, p. 1307-1315, 2008
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HAUCK, T.S.; GHAZANI, A.A.; DR, W.C.W.C. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. **Small**, v. 4, n. 1, p. 153-159, 2008
- HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, 2016.
- HE, X.M.; CARTER, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, EUA, v. 358, n. 209-215, 1992
- HEYDARIAN, A.; KHARRAT, R.; HEYDARIAN, S.; HASHEMI, A. Impact of nanoparticles on static performance of surfactant foams. **Journal of American Science**, Irã, v. 9, n. 6, p. 444-449, 2013
- HOFHEINZ; R.; GNAD-VOGT S.U.; BEYER U.; HOFHEINZ, A. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. **Anti-Cancer Drugs**, v. 16, n. 7, p. 691-707, 2005
- HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M.A. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. **Advanced Materials**, Georgia, v. 21, p. 4880-4910, 2009.
- HUANG, H.T.; LI, M.; WANG, L.; LIU, X.; SHEN, D.Y.; TANG, D.Y. Gold nanorods as single and combined saturable adsorbers for high-energy Q-switched Nd: YAG solid-state laser. **IEEE Photonics Journal**, Shanghai, China, v. 7, n. 4, 2015
- HUANG, X.; EL-SAYED, I.H.; QIAN, W.; EL-SAYED, N.A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **Journal of The American Chemical Society**, Georgia, v. 126, n. 6, p. 2115-2120, 2006

- HUNTER, D. R; HAWORTH, R. A. Haworth. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: The protective mechanisms. **Arch Biochem Biophys**, 195, n.2, 453-459, 1979
- IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 277-288, 2002
- JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C.J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 19, p. 4065-4067, 2001
- JANA, N.R. et al. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. **Advanced Materials**, v. 13, n. 18, p. 1389, 2001
- JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C.J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry**, Columbia, South Carolina, v. 105, n. 19, p. 4065-4067, 2001
- JI, X.; SONG, X.; LI, J.; BAI, Y.; YANG, W.; PENG, X. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 13939-13948, 2007.
- JUNGE, W.; NELSON, N. ATP synthase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 631-657, 2015
- JUNQUEIRA, J.S.; SILVA, P.P.; GUERRA, W. Ouro. **Química Nova na Escola**, Brasil, v. 34, p. 45-46, 2012.
- JV, Y.; LI, B.; CAO, R. Positively-charged gold nanoparticles as peroxidase mimic and their application in hydrogen peroxide and glucose detection. **Chemical Communications**, v. 46, n. 42, p. 8017-8019, 2010
- KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 42-49, 2000
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 463-471, 1999
- KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-343, 2009
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **Febs Letters**, v. 495, p. 12-15, 2001
- KREBS, H.A.; BELLAMY, D. The interconversion of glutamic acid and aspartic acid in respiratory tissues, **Biochem. J.** v. 75, p. 523-529, 1960
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robins: patologia básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 928 páginas

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A.; BABABUNMI, E. A. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by oxidation-reduction state of pyridine-nucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, p. 1690-1694, 1978

LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A. L.; QIAN, T. et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1366, p. 177-196, 1998

LESKOV, I.; NEVILLE, A.; SHEN, X.; PARDUE, S. KEVIL, C.G.; CHANGER, D.N.; KRZYWANSKI, D.M. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase activity impacts mitochondrial redox balance and the development of hypertension in mice. **Journal of the American Society of Hypertension**, 1 - 12, 2016

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 344p

LODISH, H. et al. **Biologia celular e molecular**. 7. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1244 páginas.

LOPEZ, N.; NORSKOV, J.K. Catalytic CO oxidation by a gold nanoparticle: a density functional study. **Journal of The American Chemical Society**, Dinamarca, v. 124, n. 38, p. 11262-11263, 2002

LOUIS, C.; PLUCHERY, O. Gold nanoparticles for physics, chemistry, and biology. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 1197, 2014.

LU, L.; LI, H.; QU, F.; ZHANG, X.B.; SHEN, G.L.; YU, R.Q. In situ synthesis of palladium nanoparticle-graphene nano hybrids and their application in nonenzymatic glucose biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Changsha, China, v. 26, p. 3500-3504, 2011.

MAIOLI, M. **Papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina em hepatócitos isolados de rato**. Mestrado 2012

MALTIN, K. S. The Heuristic of Form: Mitochondrial Morphology and the Explanation of Oxidative Phosphorylation. **Journal of the History Biology**, 49, 37-94, 2016

MATOS, C.R.S. **Síntese e caracterização de nanopartículas de semicondutores metálicos do tipo II-VI**. 2012. Mestrado (Dissertação de mestrado química) – UFS, São Cristóvão, 2012.

MATSUMARA, Y.; HAMAGUCHI, T.; URA, T.; MURO, K.; YAMADA, Y.; SHIMADA, Y.; SHIRAO, K.; OKUSAKA, T.; UENO, H.; IKEDA, M.; WATANABE, N. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. **British Journal of Cancer**, v. 91, p. 1775-1781, 2004

MATTHIESEN, J.; JOSE, D.; SORENSEN, C.M.; KLABUNDE, K. Loss of hydrogen upon exposure of thiol to gold clusters at low temperature. **Journal of the American Chemical Society**, EUA, v. 134, n. 22, p. 9376-9379, 2012

MEISTER, A. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**. John Wiley & Sons, 2009

MELO, P.B.; NUNES, A.M.; OMENA, L.; NASCIMENTO, S.M.S.; Da SILVA, M.G.A.; MENEGHETTI, M.R.; OLIVEIRA, I.N. Thermo-optical properties and nonlinear optical response of smectic liquid crystals containing gold nanoparticles. **Physical Review**, Maceió, Alagoas, v. 92, n. 4, p. 042504, 2015

MINGATTO, F.E. et al. In Vitro Interaction of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Oxidative Phosphorylation of Rat Kidney Mitochondria: Respiration and ATP Synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 334, n. 2, p. 303-308, 1996

MONGILLO, J. **Nanotechnology 110**. Londres: Greenwood Press, 2007. 274 páginas.

MONTERO, J.M.O. Cuando ciencia y arte se dan la mano para hacer historia. *MoleQla: Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*. N. 11, p. 2, 2013.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Princípios de fisiologia animal**. 2 ed. Artmed, 2010, 756 páginas

MURRAY, R.K. et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 29 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

MYLONAKIS, N.; ATHANASIOU, A.; ZIRA, N.; ANGEL, J.; RAPTI, A.; LAMPAKI, S.; POLITIS, N.; KARANIKAS, C.; KOSMAS, C. Phase II study of liposomal cisplatin (Lipoplatin) plus gemcitabine versus cisplatin plus gemcitabine as first line treatment in inoperable (stage IIIB/IV) non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, Grécia, v. 68, n. 2, p. 240-247, 2010

NELSON, David L., COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1274 páginas

NGUYEN, D. M.; HUSSAIN, M. The role of the mitochondria in mediating cytotoxicity of anti-cancer therapies. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 13-21, 2007

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 4**. Academic Press. An Elsevier Science Imprint. London, UK. 2013.

NIIDOME, T.; YAMAGATA, M.; OKAMOTO, Y.; AKIYAMA, Y.; TAKAHASHI, H.; KAWANO, T.; KATAYAMA, Y.; NIIDOME, Y. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications. **Journal of Controlled Release**, Japão, v. 114, n. 3, p. 342-347, 2006

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957-1962, 2003

NORTHFELT, D.W.; DEZUBE, B.J.; THOMMES, J.A.; MILLER, B.J.; FISCHL, M.A.; FRIEDMAN-KIEN, A.; KAPLAN, L.D.; MOND, C.D.; MAMELOK, R.D.; HENRY, D.H. Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. **Journal of Clinical Oncology**, California, v. 16, n. 7, p. 2445-2451, 1998

OZPOLAT, B.; SOOD, A.K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. **Journal of Internal Medicine**, Texas, v. 267, n. 1, p. 44-53, 2010.

PARAB, H.J. et al. Biosensing, cytotoxicity, and cellular uptake studies of surface-modified gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 18, p. 7574-7578, 2009

PAWLIK, T. M.; KEYOMARSI, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 59, p. 928-942, 2004

PEREIRA, M.K. **Ressonância de Plásmon de superfície localizado e espalhamento raman em soluções coloidais de ouro**. Mestrado (Mestrado em física) – UFRGS, Porto Alegre, 2009

PÉREZ-JUSTE, J.; PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZÁN, L.M.; MULVANEY, P. Gold nanorods: synthesis, characterization and applications. **Coordination Chemistry Reviews**, Merida, Mexico, v. 249, p. 1870-1901, 2005

REIS, F.H.Z. **Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014

REN, X.; CHEN, D.; MENG, X.; TANG, F.; ZHANG, A.D.L. Amperometric glucose biosensor based on a gold nanorods/cellulose acetate composite film as immobilization matrix. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, China, v. 72, n. 2, p. 188-192, 2009

REYNOLDS, C.; BARRERA, D.; JOTTE, R.; SPIRA, A.I.; WEISSMAN, C.; BOEHM, K.A.; PRITCHARD, S.; ASMAR, L. Phase II trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in first-line patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, EUA, v. 4, n. 12, p. 1537-1543, 2009

RIBEIRO, C.A.O. et al. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 304-309, 2008

SCHMID, G. **Nanoparticle: from theory to application**. Duisburg: Wiley-VCH, 2005.

SHAW III, C.F. The protein chemistry of antiarthritic gold (I) thiolates and related complexes. **Comments on Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 233-267, 1989

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1398 páginas

SILVA, F.A.S.; Da SILVA, M.G.A.; LIMA, P.R.; MENEGHETTI, M.R.; KUBOTA, L.T.; GOULART, M.O.F. A very low potential electrochemical detection of L-cysteine based on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/gold nanorods. **Biosensors and Bioelectronics**, Maceió, Alagoas, v. 50, p. 202-209, 2013

SKULACHEV, V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. **Febs Letters**, v. 423, p. 275-280, 1998

STARKOV, A.A.; POSTER, B.M., FISKUM, G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. **J. Neurochem.** v. 83, p. 220-228, 2002

SUN, Y.; XIA, YOUNAN, X. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science**, Washington, United States of America, v. 298, p. 2176-2179, 2002.

TAIT, S.W.G.; GREEN, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews**, v. 11, p. 621-632, 2010

TAKAHASHI, H.; NIIDOME, Y.; NIIDOME, T.; KANEKO, K.; KAWASAKI, H.; YAMADA, S. Modification of gold nanorods using phosphatidylcholine to reduce cytotoxicity. **Langmuir**, Japão, v. 22, n. 1, p. 2-5, 2006

TRAFTON, A. Targeting tumors using tiny gold particles. **MIT News**, 2009

TONG, L.; ZHAO, Y.; HUFF, T. B.; HANSEN, M. N.; WEI, A.; CHENG, J. X. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. **Advanced Materials**, 19, 3136, 2010

TORRE, L.A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.L.; FERLAY, J.F.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J. The color of colloidal gold. **Journal of Colloid Science**. Princenton: New Jersey. v. 9, n. 1, p. 26-35, 1954

TURNER, M.; GOLOVKO, V.B.; VAUGHAN, O.P.H.; ABDULKIN, P.; BERENQUER-MURCIA, A.; TIKHOV, M.S.; JOHNSON, B.F.G.; LAMBERT, R.M. Selective oxidation with dioxygen by gold nanoparticle catalysts derived from 22-atom clusters. **Nature**, Cambridge, UK, v. 454, p. 981-983, 2008

VALLE, V. G. R.; FAGIAN, M. M.; PARENTONI, L. S.; MEINICKE, A. R.; VERCESI, A. E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, p. 1-7, 1993

- VERCESI, A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked nad(p) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat-liver mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 252, p. 171-178, 1987
- VYAS, S.; ZAGANJOR, E.; HAIGIS, M. C. Mitochondria and Cancer. **Cell**, 166, 2016
- XU, X.; LIU, X.; LI, Y. YING, Y. A simple and rapid optical biosensor for detection of aflatoxin B1 based on competitive dispersion of gold nanorods. **Biosensors and Bioelectronics**, China, v. 47, p. 361-367, 2013
- WALLACE, D.C. Mitochondria and cancer. **Nature Reviews**, v. 12, p. 685-698, 2012
- WANG R.; BILLONE, P.S.; MULLETT, W.M. Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. **Journal of Nanomaterials**, Ottawa, Canada, v. 2013, p. 1-12, 2013
- WANG, S.; LU, W.; TOVMACHENKO, OLEG, RAI, U.S.; YU, H.; RAY, P.C. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, Jackson, EUA, v 463, p. 145-149, 2008.
- WANG S.; KRISTIAN, N.; JIANG, S.; WANG, X. Controlled deposition of Pt on Au nanorods and their catalytic activity towards formic acid oxidation. **Electrochemistry Communications**, Singapura v, 10, n. 1, p. 961-964, 2008
- WANG, L. et al. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. **Nano Letters**, Japão, v. 11, n. 2, p. 772-780, 2011
- WANG, A.Z.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. Nanoparticle delivery of cancer drugs. **Annual Review of Medicine**, Carolina do Norte, v. 63, p. 185-198, 2012
- WANG, C. et al. Biorecognition-driven self-assembly of gold nanorods: a rapid and sensitive approach toward antibody sensing. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 24, p. 5809-5811, 2007
- WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, New York, v. 124, n. 3215, p. 269-270, 1956
- WARBURG, O. The metabolism of carcinoma cells. **The Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148-163, 1925
- WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008, 843 páginas
- WILSON, J.D.; BIGELOW, C.E.; CALKINS, D.J.; FOSTER, T.H. Light scattering from intact cells reports oxidative-stress-induced mitochondrial swelling. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 4, p. 2929-2938, 2005
- ZARBIN, A.J.G. Química de (Nano)materiais. **Química Nova**, Curitiba, PR, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

10 Facts about cancer. **World Health Organization**, 2013

YU, C. X.; IRUDAYARAJ, J. Multiplex biosensor using gold nanorods. **Analytical Chemistry**, 79, 572-579, 2007

ANEXO 1

ANEXO 1 - FLUXOGRAMA

