



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MARIA DE FÁTIMA CORREIA DA SILVA NETA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SELÊNIO (SeNPs) E SELÊNIO-COBRE (SeCuNPs) COM POTENCIAL FOTOPROTETOR E ANTIOXIDANTE

Maceió - AL
2020

MARIA DE FÁTIMA CORREIA DA SILVA NETA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SELÊNIO (SeNPs) E
SELÊNIO-COBRE (SeCuNPs) COM POTENCIAL FOTOPROTETOR E ANTIOXIDANTE

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Santos Anunciação

Coorientadora: Prof. Dr^a. Cintya D'Angeles do Espírito Santo Barbosa

Maceió - AL
2020

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

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

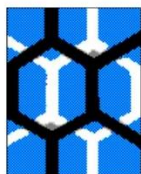
S586s Silva Neta, Maria de Fátima Correia da.
Síntese e caracterização de nanopartículas de selênio (SeNPs) e selênio-cobre (SeCuNPs) com potencial fotoprotetor e antioxidante / Maria de Fátima Correia da Silva Neta. – 2021.
99 f. : il color.

Orientadora: Daniela Santos Anunciação.
Co-orientadora: Cintya D'Angeles do Espírito Santo Barbosa.
Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 87-99.

1. Selênio. 2. Cobre. 3. Quitosana. 4. Álcool de polivinil. 5. Antioxidantes. 6. Tirosinase. 7. Fator de proteção solar. 8. *Drosophila*.
I. Título.

CDU: 66.094.3.097.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **Maria de Fátima Correia da Silva Neta** intitulada: “Síntese e caracterização de nanopartículas de selênio (SeNPs) e selênio-Cobre (SeCuNPs) com potencial fotoprotetor e antioxidante”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 18 de dezembro de 2020, às 15h, por meio de videoconferência.

Comissão Examinadora:

Francisco Cunha

Dr. FRANCISCO ANTÔNIO DA SILVA CUNHA, UFAL

Examinador Externo à Instituição

Camila Braga Dornelas

Dr^a. CAMILA BRAGA DORNELAS, UFAL

Examinadora Externa ao Programa

Ana Maria Queijeiro Lopez

Dr^a. ANA MARIA QUEIJEIRO LOPEZ, UFAL

Examinadora Interna

Cintya D'Angeles do Espírito Santo Barbosa

Dr^a. CINTYA D'ANGELES DO ESPIRITO SANTO
BARBOSA, UFAL

Examinadora Interna

Daniela Santos Anunciacao

Dr^a. DANIELA SANTOS ANUNCIACAO, UFAL

Presidente

Dedico este trabalho a minha família, por todo amor, carinho e incentivo para superar qualquer obstáculo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata a Deus, por estar sempre comigo me ajudando em todos os momentos.

Sou grata também a minha mãe Maria Cícera e ao meu pai José Roosevelt, muito obrigado por todo o amor, carinho e compreensão, por sempre acreditarem em mim, e por se esforçarem pra me ajudar sempre, EU AMO VOCÊS! Vocês são incríveis, admiro muito vocês, Deus não poderia ter me dado uma família melhor. Também sou grata ao meu irmão Roosevelt (Netto), por estar ao meu lado, me faz raiva e abusa, mas mesmo assim eu amo, você é meu chatinho favorito e sei que você me ama também, do seu jeito, mas ama.

Sou muito grata ao meu noivo Flaviano Santos, por todo amor, carinho, compreensão e paciência. Você sempre me apoia em tudo, já até perdi a conta das vezes que você ia me buscar na UFAL, não importava a hora, você sempre estava lá quando eu pedia. E nos momentos de estresse e agonia sempre tentando me acalmar, nem que fosse com chocolate, que aliás, sempre dava certo rsrs. Enfim, obrigada por estar comigo em todos os momentos, além de noivo, você é um grande amigo. E nesse ano, que já está às portas, se tornará meu esposo e parceiro de vida. Te amo, meu amor!

Agradeço também aos meus avós Luiz Pedro e Deuza Maria e aos meus tios, tias, primos e primas (que não vou citar, pois são muitos), por todo carinho, apoio e incentivo, não existe família melhor que a nossa! Amo vocês!

Sou grata a Daniela, minha orientadora e minha Prof (a quem chamo carinhosamente de prof, em qualquer lugar sempre sai um “prof mulher, a senhora”), você sabe que é mais que minha orientadora, é uma amiga, minha mãe científica e uma pessoa fantástica. Amo seus conselhos, seu carinho, sempre se preocupando não só comigo, mas com todos, quando estou aperreada sempre corro para senhora, que como sempre me acalma e em poucos minutos já estamos dando risadas. Também agradeço a Cintya, que se tornou minha coorientadora. No período em que a prof viajou a senhora segurou firme e me ajudou a seguir com o trabalho, sempre muito atenciosa e pronta para ajudar, mesmo em meio a tanta correria, quando eu chegava com alguma dúvida a senhora me dava mil ideias para solucionar os problemas. Sou muito grata por tê-la como minha coorientadora. Agradeço também ao professor Josué, que como sempre fez me ajudou com o trabalho, estabelecendo parcerias e abrindo caminho para novas perspectivas. O senhor é um excelente professor, que eu admiro e respeito muito. Sempre serei grata ao professor Dimas pelo carinho e pela indicação para a professora. Agradeço também a professora Ísis, que faz parte do Linqa e é uma excelente professora.

Quero agradecer também a minha amiga Lilynha, que ao longo do meu mestrado, na verdade desde que nos conhecemos sempre foi um amorzinho de pessoa, quando eu estava aperreada e ia conversar você sempre me acalmava, via um lado positivo em tudo, sempre orava para que desse tudo certo, muito obrigada, sua linda!

Agradeço aos meus amigos do laboratório, do qual tenho a honra de fazer parte, não somos apenas um laboratório, mas uma família (a família Linqa). Sou grata ao Wood, meu grande amigo, que sempre me ajuda e tira minhas dúvidas, eu apareço com um problema ele pensava, conversava e me dava uma solução, obrigada também pelas análises, foi muito bom trabalhar com você, e com aquelas playlists ficava tudo leve. Outra pessoa que tem uma ótima playlist é o Ari com quem pude trabalhar, devido a este trabalho, gostei muito de trabalhar com você, apesar da grande quantidade de trabalho (que nos levou alguns feriados e fins de semana), tivemos momentos de descontração e muita resenha pra aliviar. Sou grata às minhas lindas e queridas Flygirls (Karol e Amanda), trabalhar juntas só nos aproximou ainda mais, apesar dos estresses de ir contar mosca no fim de semana e do monte de trabalho, era legal por que tinha vocês, para descontrair tudo e deixar leve. Sou grata também às meninas do lab, Ary (minha irmã do coração, uma pessoa incrível), Thamilla (minha conselheira, amo as nossas conversas), Janaína (Minha parceira de sextou no lab kkk), Mayara (resenheira sempre tirando onda da galera), Marina (esse amor de pessoa), Célia (resenheira também, me divirto contigo) vocês são uns amores, amo cada uma de vocês. Fazem parte da família Anunciação, Raphael, que foi o primeiro, foi muito bom te conhecer irmão, obrigada pela amizade, foram muitos momentos compartilhados, lembro das nossas orações antes das provas de orgânica, graças a Deus, conseguimos passar. Sou grata ao Emerson, sempre disposto a ajudar, obrigada por tirar minhas dúvidas e ajudar quando preciso. Agradeço também ao Jaelson, pelas ajudas e pelas resenhas no lab. Sou grata também aos demais integrantes do Linqa, que tornam o nosso ambiente de trabalho sempre agradável (Danda, Karine, Karla e Francisco).

Agradeço aos meus queridos amigos Patinho e Jorginho pela amizade e carinho, vocês são amigos maravilhosos e vou levá-los comigo para o resto da vida, lembro dos nossos momentos de descontração no lab de vocês estudando e ouvindo aquela musiquinha que não podia faltar. Agradeço também ao meu ex-amigo Guimarães pela amizade, pelas resenhas e principalmente pelas fofocas kkkk.

“Eles passarão... eu passarinho!”
Mário Quintana

RESUMO

Nanopartículas (NPs) contendo selênio têm sido bastante estudadas devido às propriedades terapêuticas associadas a diversos sistemas. No que se refere a aplicações biotecnológicas ainda há poucas informações disponíveis acerca de NPs de selênio e selênio-cobre. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de selênio (SeNPs) e selênio-cobre (SeCuNPs) para avaliação do seu potencial antioxidante e fotoprotetor. Para tanto, as NPs foram sintetizadas utilizando os estabilizantes quitosana (QUI) e álcool polivinílico (PVA). As sínteses foram adaptadas de procedimentos já descritos na literatura. As características das NPs foram avaliadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM); espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDX); espalhamento dinâmico de luz (DLS); espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de absorção molecular na região do UV-vis. Foram efetuados testes para avaliar a capacidade antioxidante, por meio dos métodos de ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP; fator de proteção solar (FPS) e inibição da tirosinase; e avaliação da toxicidade *in vivo*, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo. Os dados de caracterização confirmaram a formação e identidade dos materiais sintetizados. Empregando-se TEM, verificou-se que as SeCuNPs nos dois estabilizantes possuem tamanho inferior às SeNPs, com uma redução de tamanho de 94 e 78 nm para 36 e 35 nm em QUI e PVA, respectivamente. Por meio da técnica de EDX, comprovou-se a presença de Se e Cu nas SeCuNPs, constatando tratar-se de um material bielementar. Os espectros de FTIR, das SeNPs e das SeCuNPs, exibiram perfis característicos dos agentes estabilizantes, comprovando a presença desses na superfície das NPs. Os espectros de absorção no UV-vis evidenciaram as bandas de absorção características de tais materiais, com absorção em 260 e 250 nm para as SeNPs estabilizadas em QUI e PVA, respectivamente, e em 240 e 900 nm para as SeCuNPs nos dois estabilizantes. Com relação às aplicações, ambas NPs apresentaram alta atividade antioxidante, superior aos padrões trolox®, ácido ascórbico e quercetina. As NPs apresentaram aproximadamente o dobro do valor do FPS quando comparadas ao 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BZF-3), composto presente em formulações comerciais, sendo os valores de FPS de SeCuNPs maiores que SeNPs. Nos ensaios de inibição da tirosinase as SeNPs exibiram valores de IC₅₀ de 4,8 e 10,1 mg L⁻¹, para SeNPs_QUI e SeNPs_PVA, respectivamente, enquanto as SeCuNPs foram capazes de inibir a enzima apenas em concentrações superiores a 50 mg L⁻¹. Os ensaios de toxicidade com modelo de *Drosophila melanogaster* evidenciaram que ambas NPs apresentaram toxicidade em concentrações ≥ 50 mg L⁻¹, indicando elevada tolerância dos organismos às NPs avaliadas. Tais resultados revelaram que SeNPs e SeCuNPs são promissoras para as aplicações propostas neste trabalho.

Palavras-Chave: selênio, cobre, quitosana, PVA, antioxidante, tirosinase, FPS, *Drosophila*

ABSTRACT

Selenium-containing nanoparticles (NPs) have been extensively studied due to the therapeutic properties associated with various systems. Regarding biotechnological applications there is still little information available about selenium and selenium-copper NPs. The present work aimed to synthesize and characterize selenium (SeNPs) and selenium-copper (SeCuNPs) nanoparticles to evaluate their antioxidant and photoprotective potential. To this end, the NPs were synthesized using the stabilizers chitosan (QUI) and polyvinyl alcohol (PVA). The syntheses were adapted from procedures already described in the literature. The characteristics of the NPs were evaluated by transmission electron microscopy (TEM); energy dispersive X-ray spectrometry (EDX); dynamic light scattering (DLS); Fourier transform infrared molecular absorption spectroscopy (FTIR) and UV-vis molecular absorption spectroscopy. Tests were performed to evaluate the antioxidant capacity, by means of ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP methods; sun protection factor (SPF) and tyrosinase inhibition; and *in vivo* toxicity evaluation, using *Drosophila melanogaster* as a model. Characterization data confirmed the formation and identity of the synthesized materials. Employing TEM, the SeCuNPs in the two stabilizers were found to be smaller in size than the SeNPs, with a size reduction from 94 and 78 nm to 36 and 35 nm in QUI and PVA, respectively. By means of the EDX technique, the presence of Se and Cu in SeCuNPs was verified, proving to be a bi-elementary material. The FTIR spectra of the SeNPs and SeCuNPs showed characteristic profiles of the stabilizing agents, proving their presence on the surface of the NPs. The UV-vis absorption spectra showed the characteristic absorption bands of such materials, with absorption at 260 and 250 nm for the SeNPs stabilized in QUI and PVA, respectively, and at 240 and 900 nm for the SeCuNPs in both stabilizers. Regarding the applications, both NPs showed high antioxidant activity, superior to the standards trolox®, ascorbic acid and quercetin. The NPs presented approximately twice the SPF value when compared to 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BZF-3), compound present in commercial formulations, being the SPF values of SeCuNPs higher than SeNPs. In tyrosinase inhibition assays SeNPs exhibited IC₅₀ values of 4.8 and 10.1 mg L⁻¹, for SeNPs_QUI and SeNPs_PVA, respectively, while SeCuNPs were able to inhibit the enzyme only at concentrations higher than 50 mg L⁻¹. Toxicity assays with *Drosophila melanogaster* model evidenced that both NPs exhibit toxicity at concentrations ≥ 50 mg L⁻¹ indicating high tolerance of organisms to the evaluated NPs. Such results revealed that SeNPs and SeCuNPs are promising for the applications proposed in this work.

Keywords: selenium, copper, chitosan, PVA, antioxidant, tyrosinase, SPF, *Drosophila*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo das abordagens <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> para obtenção de nanopartículas.....	21
Figura 2 - Ilustração do mecanismo de crescimento de NPs pelo modelo de La Mer.	23
Figura 3 - Ilustração da diferença de tamanho das NPs por técnicas de TEM e DLS.....	25
Figura 4 - Gráfico do número de publicações indexadas na base de dados <i>Web of Science</i> para o período dos últimos 10 anos (2010-2020): Barras em rosa para os termos “selenium nanoparticles” e barras azuis para “selenium” AND “copper” AND “nanoparticles”	34
Figura 5 - Reação do ABTS ^{•+} em sua forma oxidada e reduzida.	36
Figura 6 - Reação do DPPH [•] em sua forma oxidada e reduzida.....	37
Figura 7 - Complexos férrico e ferroso característicos do método FRAP..	38
Figura 8 - Esquema resumido do papel da tirosinase na síntese da melanina.....	41
Figura 9 - Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Figura 10 - Esquema geral de síntese das nanopartículas bielementares (SeCuNPs).	47
Figura 11 - Fotografia das soluções de nanopartículas: a) SeCuNPs_QUI, b) SeNPs_QUI, c) SeCuNPs_PVA e d) SeNPs_PVA	55
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.	56
Figura 13 - Espectro de EDX das nanopartículas: a) SeNPs_QUI, b) SeNPs_PVA, c) SeCuNPs_QUI e d) SeCuNPs_PVA.....	58
Figura 14 - Mapeamento químico das nanopartículas sintetizadas: a) imagem de TEM das SeCuNPs_QUI, b) mapeamento de selênio nas SeCuNPs_QUI, c) mapeamento de cobre nas SeCuNPs_QUI, d) imagem de TEM das SeCuNPs_PVA, e) mapeamento de selênio nas SeCuNPs_PVA e f) mapeamento de cobre nas SeCuNPs_PVA.....	59
Figura 15 - Histogramas de DLS das nanopartículas: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA	60
Figura 16 - Espectros de FTIR: a) quitosana (QUI), SeNPs_QUI e SeCuNPs_QUI e b) PVA, SeNPs_PVA e SeCuNPs_PVA	61
Figura 17 - Espectros de absorção das nanopartículas no UV-vis: a) NPs estabilizadas em quitosana e b) NPs estabilizadas em PVA.....	63
Figura 18 - Capacidade antioxidante das NPs sintetizadas e dos padrões, pelo método ABTS ^{•+}	65

Figura 19 - Capacidade antioxidante das NPs pelo método DPPH•: a) IC ₅₀ das nanopartículas e b) Comparação das médias usando teste de Tukey para um intervalo de confiança de 95%.	66
Figura 20 - Curvas analíticas dos padrões e das nanopartículas sintetizadas para determinação da capacidade de redução de íons Fe ³⁺	67
Figura 21 - Capacidade antioxidante das NPs sintetizadas, pelo método FRAP: a) Sensibilidade das nanopartículas e b) Comparação das médias por meio do teste de Tukey para um intervalo de confiança de 95%.	69
Figura 22 - Espectros de absorção das nanopartículas nas regiões UVA e UVB ($\lambda = 260-400$ nm): a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA, d) SeCuNPs_PVA, e) BZF-3 e f) Curvas analíticas das nanopartículas e do padrão.	70
Figura 23 - Valores de FPS para as nanopartículas e o padrão BZF-3 nas concentrações de 20 e 30 mg L ⁻¹	72
Figura 24 - Curva cinética de inibição da tirosinase do padrão e das nanopartículas: a) Ácido kójico, b) SeNPs_QUI, c) SeCuNPs_QUI, d) SeNPs_PVA, e) SeCuNPs_PVA e f) Valores de IC ₅₀ para as nanopartículas e compostos avaliados.	74
Figura 25 - Gráficos de pupação larval do inseto <i>D. melanogaster</i> ao longo dos dias para as NPs e estabilizantes: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.	75
Figura 26 - Gráficos de porcentagem de pupação em função da concentração: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.	76
Figura 27 - Gráficos de percentual da mortalidade larval em função da concentração: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.	77
Figura 28 - Gráficos do percentual de emergência de moscas adultas: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.	78
Figura 29 - Gráficos de porcentagem de pupação em função da concentração: a) QUI e e) PVA; gráficos de porcentagem de pupação em função da concentração: b) QUI e f) PVA; gráficos de percentual da mortalidade larval em função da concentração: c) QUI e g) PVA; e gráficos do percentual de emergência de moscas adultas: d) QUI e h) PVA.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedimentos de síntese de SeNPs pelo método de redução química.	28
Tabela 2 - Métodos de síntese e aplicação de nanopartículas bielementares.	33
Tabela 3 - Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda da região UVB.....	52
Tabela 4 - Valores de FPS para o padrão e para as nanopartículas sintetizadas nas concentrações de 20 e 30 mg L ⁻¹	72
Tabela 5 - Comparação entre os resultados da análise de toxicidade para as nanopartículas avaliadas em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 50 mg L ⁻¹)	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorvância
ABTS	Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>Analysis of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de soro bovino
BZF-3	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona
CTBA	Brometo de cetiltrimetilamônio
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (do inglês <i>Dynamic light scattering</i>)
DPPH	Radical 2,2-difenil-2-picrilidrazila
EDX	Espectroscopia por energia dispersiva raios X (do inglês <i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
FRAP	Potencial de redução do ferro
FTIR	Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GPx	Glutathiona peroxidase
IC₅₀	Concentração mínima necessária para inibir 50% do radical ou da enzima
NPs	Nanopartículas
PEG	Polietileno glicol
PVA	Álcool polivinílico
QUI	Quitosana
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Sec	Selenocisteína
SeNPs	Nanopartículas de selênio
SeNPs_PVA	Nanopartículas de selênio estabilizadas em PVA

SeNPs_QUI	Nanopartículas de selênio estabilizadas em quitosana
SeCuNPs	Nanopartículas de selênio-cobre
SeCuNPs_PVA	Nanopartículas de selênio-cobre estabilizadas em PVA
SeCuNPs_QUI	Nanopartículas de selênio-cobre estabilizadas em quitosana
SPR	Ressonância plasmônica de superfície (do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês <i>Transmission electron microscopy</i>)
TrxR-1	Tiorredoxina redutase-1
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Nanomateriais	20
2.2 Síntese de nanopartículas	21
2.3 Caracterização de nanopartículas	24
2.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	24
2.3.2 Espectrometria de raios X por energia dispersiva.....	24
2.3.3 Espalhamento dinâmico de luz.....	25
2.3.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.3.5 Espectroscopia de absorção molecular no UV-vis.....	26
2.4 Nanopartículas de selênio	26
2.4.1 Uso de nanopartículas de selênio na literatura.....	29
2.5 Materiais multielementares de selênio	32
2.5.1 Nanopartículas de selênio-cobre.....	33
2.6 Aplicações	35
2.6.1 Capacidade antioxidante.....	35
2.6.1.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS ^{•+}	36
2.6.1.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH [•]	37
2.6.1.3 Ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP).....	37

2.6.2 Fotoproteção.....	38
2.6.3 Inibição da tirosinase.....	40
2.6.4 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	41
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVOS	44
4.1 Geral	44
4.2 Específicos	44
5 EXPERIMENTAL	45
5.1 Reagentes e soluções	45
5.2 Materiais e equipamentos utilizados.....	46
5.3 Síntese das nanopartículas.....	47
5.4 Caracterização das nanopartículas.....	48
5.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	48
5.4.2 Espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDX)	49
5.4.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	49
5.4.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	49
5.4.5 Espectroscopia de absorção molecular no UV-vis	49
5.5 Aplicações biotecnológicas de SeNPs e SeCuNPs	50
5.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante de SeNPs e SeCuNPs.....	50
5.5.1.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS* ⁺	50
5.5.1.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH*.....	51
5.5.1.3 Ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP).....	51
5.5.2 Fator de Proteção Solar UVB <i>in vitro</i>	52
5.5.3 Inibição da tirosinase	53
5.5.4 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	54
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

6.1 Síntese das nanopartículas	55
6.2 Caracterização das nanopartículas	56
6.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	56
6.2.2 Espectrometria de raios X por energia dispersiva	57
6.2.3 Espalhamento dinâmico de luz	59
6.2.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	61
6.2.5 Espectroscopia de absorção molecular no UV-vis	62
6.3 Aplicações biotecnológicas de SeNPs e SeCuNPs	64
6.3.1 Avaliação da capacidade antioxidante de SeNPs e SeCuNPs.....	64
6.3.1.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS ^{•+}	64
6.3.1.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH [•]	65
6.3.1.3 Ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP).....	67
6.3.2 Fator de Proteção Solar UVB <i>in vitro</i>	70
6.3.3 Inibição da tirosinase	73
6.3.4 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	75
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
8 PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Os nanomateriais têm recebido grande atenção pelo seu papel no desenvolvimento científico e tecnológico. As propriedades físicas, químicas, biológicas, ópticas e eletrônicas concernentes ao seu tamanho (nanométrico), proporcionam uma diversidade de aplicações, que perpassam os campos optoeletrônico, catalítico, eletroquímico, ambiental, biomédico e alimentício (DHAN, et al., 2015; EALIAS, SARAVANAKUMAR, 2017; JEEVANANDAM, et al., 2018). Dentre esses materiais, as nanopartículas (NPs) de selênio merecem destaque especial, pelo seu potencial terapêutico (CHHABRIA, DESAI, 2016; BOROUMAND, et al., 2019; KHURANA, et al., 2019).

As nanopartículas de selênio (SeNPs) têm despertado interesse devido às suas diversas atividades biológicas e baixa toxicidade quando comparadas a outras espécies de selênio. O potencial desses materiais tem sido explorado frente a doenças como câncer, diabetes e distúrbios inflamatórios (SAKR, KORANY, KATTI, 2018; KHURANA, et al., 2019). Além disso, são utilizadas como carreadores de fármacos (MENON, et al., 2018) e são promissoras na suplementação e segurança alimentar (BARTŮNĚK, et al., 2015; SKALICKOVA, 2017; HOSNEDLOVA, et al., 2018).

No que diz respeito à síntese de novos materiais para aplicações diversas, surgem as NPs bi ou multielementares, compostas por mais de um elemento. Esse tipo de síntese permite associar as propriedades de diferentes espécies químicas, levando à obtenção de um material com propriedades mais atrativas quando comparadas aos materiais monoelementares/puros (WADHWAN, et al., 2016; SHARMA, et al., 2019).

O cobre, elemento utilizado para compor as nanopartículas bielementares, é um micronutriente que participa de processos importantes no organismo humano (RODRIGUES, SILVA, GUERRA, 2012). Materiais de cobre têm sido utilizados para as mais diversas aplicações, que vão desde a catálise à ação antibacteriana e anticâncer (DIN, REHAN, 2017; KHAN, JAMEEL, 2018).

Em se tratando de materiais bielementares contendo selênio e cobre, verifica-se uma carência de estudos que contemplem a síntese, caracterização e aplicação desses, quando comparados aos trabalhos com SeNPs puras. Os trabalhos encontrados são, em grande parte, restritos à investigação de propriedades ópticoeletrônicas (DORFS, et al., 2011; SCOTOGNELLA, et al., 2011) e alguns com aplicações para fotocalisadores e biossensores

(NOURI, et al., 2017; GONG, et al. 2020; SHITU, et al., 2020). Havendo, portanto, uma possibilidade promissora de estudar estas NPs quanto às aplicações.

Dessa maneira, a realização deste trabalho está pautada na possibilidade de sintetizar e caracterizar nanopartículas de selênio e nanopartículas de selênio-cobre (SeCuNPs) em diferentes agentes estabilizantes, avaliando o potencial antioxidante e fotoprotetor, propriedades pouco exploradas, tendo em vista as possíveis aplicações biotecnológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanomateriais

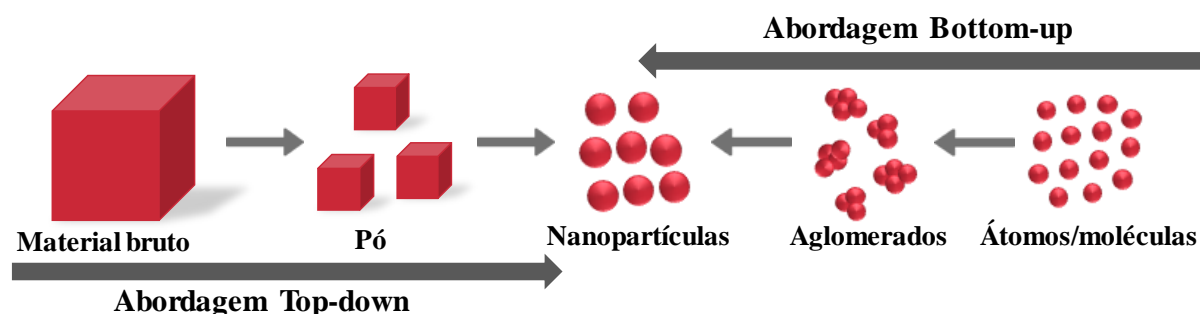
A nanotecnologia é um campo promissor da ciência, e os nanomateriais, seu principal objeto de estudo, possuem características únicas e superiores quando comparados com seus materiais macroscópicos, como alta reatividade, ampla área superficial, resistência e sensibilidade (EALIAS, SARAVANAKUMAR, 2017; KHAN, SAEED, KHAN, 2019). Estes materiais podem ser classificados em zero, uni ou bidimensionais (0D, 1D e 2D), de acordo com as dimensões fora da escala nanométrica, que varia de 1 a 100 nm (VERT et al., 2014). Quando todas as dimensões de um material possuem escala nanométrica (0D), este é classificado como nanopartícula, a exemplo das NPs metálicas, dos pontos quânticos (*quantum dots*) e dos pontos quânticos de carbono (*carbon dots*). Os materiais que contêm uma dimensão fora da nanoescala são considerados 1D, como por exemplo as nanofibras, nanobastões e os nanotubos de carbono. E os nanomateriais 2D, são os que apresentam duas dimensões fora da nanoescala, como nanofilmes e nanofolhas. (DHAND, et al., 2015; MAZHAR, SHRIVASTAVA, TOMAR, 2017).

Os nanomateriais também podem ser classificados de acordo com sua forma e composição. Baseados em sua forma classificam-se como nanoesferas, nanobastões, nanotubos, nanocristais, nanocápsulas e nanofibras (WONG, CHOI, 2015; HEERA, SHANMUGAM, 2015; DHAND, et al., 2015). Conforme sua composição são categorizados em nanomateriais à base de carbono, como os pontos quânticos, fulerenos, nanotubos e nanofibras de carbono; à base de espécies inorgânicas, que incluem as nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos, de semi-condutores e de calcogênios como selênio; à base de espécies orgânicas, a exemplo as NPs de polímeros, lipossomas e dendrímeros; e os baseados em compósitos, que são materiais oriundos da combinação de nanomateriais e materiais em tamanho macroscópico. (JEEVANANDAM, et al., 2018; MAL, 2018). A depender do tamanho, forma e composição os nanomateriais podem apresentar diferentes propriedades, tais como optoeletrônicas, magnéticas, térmicas, mecânicas, químicas, físicas e biológicas (KHAN, SAEED, KHAN, 2019; DHAND, et al., 2015).

No que se refere à síntese desses materiais, duas abordagens gerais são empregadas, *top-down*, de cima para baixo, e *bottom-up*, de baixo para cima (Figura 1). A abordagem *top-down* é um processo destrutivo, onde o material em maior escala é reduzido por meio de

métodos físicos a partículas em escala nanométrica (JEEVANANDAM, et al., 2018; JAMKHANDE, et al., 2019). Hu e colaboradores (2011), por exemplo, sintetizaram pontos quânticos de carbono utilizando essa abordagem, partindo de fragmentos de grafite e aplicando o método de ablação a laser para obter as NPs. Por outro lado, a abordagem *bottom-up* é um processo construtivo, no qual átomos ou moléculas se aglomeram para formar NPs, geralmente envolvendo processos químicos. Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Zeng e colaboradores (2018), que realizaram a síntese de nanopartículas de selênio através da redução química de selenito de sódio (Na_2SeO_3).

Figura 1 - Esquema representativo das abordagens *top-down* e *bottom-up* para obtenção de nanopartículas



Fonte: Adaptado de WIKRAM, et al., 2017.

Dessas abordagens a mais utilizada é a *bottom-up*, em virtude da facilidade no controle de tamanho e morfologia das partículas, levando a uma maior homogeneidade e reprodutibilidade nas sínteses (NUNES, 2017).

2.2 Síntese de nanopartículas

Existem diversos métodos para a síntese de NPs, dentre os principais têm-se a síntese hidrotérmal, a solvotérmal, a assistida por micro-ondas, a síntese por meio de eletrodeposição, a síntese por ablação a laser, biossíntese e o método de síntese por redução química (IRAVANI, et al., 2014; JAMKHANDE, et al., 2019).

Na síntese hidrotérmal, as reações ocorrem em um sistema fechado, sob condições acima da temperatura e pressão ambiente (25°C , 1 atm), em uma única etapa, em um reator de teflon revestido com aço inoxidável (HUANG, LU, YANG, 2019). Na síntese assistida por micro-ondas, este equipamento é geralmente utilizado como uma forma alternativa de aquecimento em sínteses hidrotérmicas. O micro-ondas fornece um aquecimento mais homogêneo e rápido, quando comparado com as formas convencionais (ZHU, et al., 2011).

O método solvotermal é realizado sob as mesmas condições que o método hidrotermal, porém, ao invés do uso da água, utilizam-se outros solventes, ou faz-se o uso de um meio aquo-orgânico, com diferentes proporções de água e solvente (JAMKHANDE, et al., 2019).

No método de síntese por eletrodeposição, uma corrente elétrica é utilizada para reduzir os íons de selênio a nanopartículas. A síntese é realizada em uma célula eletroquímica controlada por um potenciostato (CHHABRIA, DESAI, 2016; JAMKHANDE, et al., 2019).

Na síntese pelo método de ablação a laser utiliza-se um laser de alta potência que irradia partículas de uma fonte sólida; a reação pode ocorrer em meio líquido ou gasoso e o material é evaporado ou transformado em plasma, a depender do fluxo do laser, produzindo as nanopartículas (DHAND, et al., 2015; HEERA, SHANMUGAM, 2015; EALIAS, SARAVANAKUMAR, 2017).

Os métodos de biossíntese, também conhecidos como métodos verdes, envolvem a utilização de diferentes micro-organismos, extratos vegetais ou enzimas para reduzir os íons de selênio, sem a necessidade de temperatura ou pressão controlada, uma vez que geralmente ocorrem em condições ambiente (HEERA, SHANMUGAM, 2015; JAMKHANDE, et al., 2019).

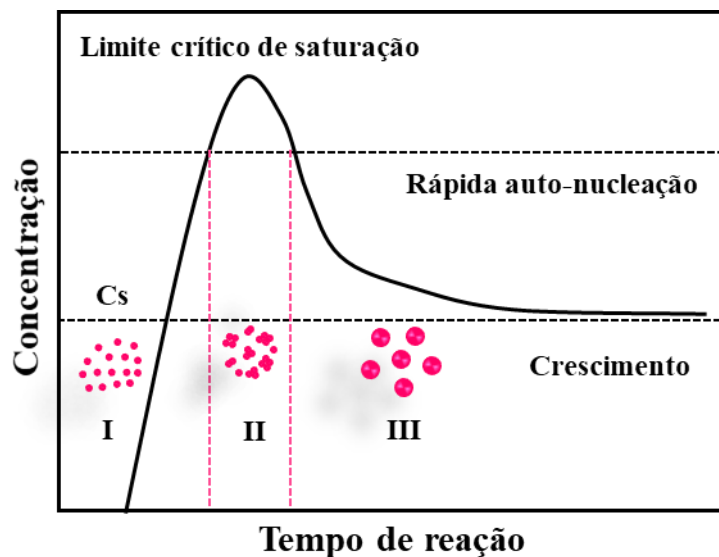
A redução química é um dos métodos mais comuns para sintetizar NPs, pois as condições de síntese são brandas, a reação geralmente acontece em meio aquoso e temperatura de 25° C. As NPs são sintetizadas a partir da redução de um sal do elemento desejado, normalmente na presença de um agente estabilizante (SIGUERO, 2016; MATES, et al., 2019; BOROUMAND, et al., 2019).

Em geral a síntese de NPs envolve o uso de agentes estabilizantes, que são utilizados para mantê-las estáveis como os polímeros, as proteínas, monossacarídeos, polissacarídeos e surfactantes (ZHANG, 2015; ZHANG, 2018). Além de auxiliar na estabilidade das NPs, são utilizados para o controle do tamanho durante a síntese (SCHLADT, et al., 2011).

Independente da metodologia empregada, a formação de NPs, de uma maneira geral, perpassa por dois processos, nucleação e crescimento. Segundo o modelo clássico de La Mer, originalmente desenvolvido para suspensões aquosas de colóides, na etapa de nucleação os núcleos iniciais são formados e se agregam formando aglomerados, e na etapa final de crescimento, os aglomerados se unem para formar as NPs. A etapa de nucleação é rápida e a

de crescimento lenta (Figura 2) (SCHLADT, et al., 2011; SOUSA FILHO, SERRA, 2015; POLTE, 2015).

Figura 2 - Ilustração do mecanismo de crescimento de NPs pelo modelo de La Mer.



Fonte: Adaptado de CHENGPENG, 2017.

De modo geral, as nanopartículas são instáveis, tendem a aglomerar-se ao longo do tempo e, no caso das SeNPs, se transformam em um análogo cinza, que é inativo (ZHAI, et al., 2017; BAI, et al., 2017; SONG, et al., 2020). Uma maneira de manter as NPs estáveis e controlar seu tamanho é a utilização de agentes estabilizantes, os quais se adsorvem na superfície das partículas impedindo mais ocorrências de nucleação e por consequência afetam também o crescimento, além do que, após a síntese se mantém na superfície das NPs impedindo a agregação dessas partículas (POLTE, 2015).

Dentre os mais diversos agentes estabilizantes, os polímeros são amplamente utilizados e considerados uma excelente alternativa (ZHANG, et al., 2017; CHHABRIA, DESAI, 2018). Dessa maneira, os polímeros quitosana e o álcool polivinílico (PVA) foram escolhidos para estabilizar as NPs sintetizadas, uma vez que a estabilidade é fundamental para a etapa de aplicação.

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, encontrada principalmente no exoesqueleto de insetos e crustáceos e na parede celular de alguns fungos. Sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade são os principais fatores pelos

quais é utilizada como estabilizante (LARANJEIRA, FÁVERE, 2009; CHEN, et al., 2015; SONG, et al., 2020). Assim como a quitosana, o PVA é um polímero não tóxico, biocompatível e eficiente para estabilização no preparo de nanopartículas (WANG, et al., 2018; BOROUMAND, et al., 2019).

2.3 Caracterização de nanopartículas

A caracterização de NPs envolve a obtenção de informações acerca do tamanho e morfologia, características estruturais, como composição elementar e presença de grupos funcionais na superfície, perfil espectral no que tange à interação com a radiação eletromagnética, dentre outras propriedades. Para tanto, se faz necessário o uso de uma série de técnicas uma vez que cada técnica fornece informações a respeito de determinada propriedade físico-química do material. A seguir, há uma breve descrição das técnicas de caracterização empregadas para elucidar as propriedades das NPs sintetizadas no presente trabalho.

2.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM - *Transmission Electron Microscopy*) é uma importante técnica de caracterização de nanomateriais que permite a visualização da morfologia, bem como a avaliação do tamanho das nanopartículas. Muitos trabalhos envolvendo NPs fazem uso apenas da TEM a fim de confirmar as características morfológicas de materiais previamente sintetizados para dar seguimento à etapa de aplicação. Esta técnica consiste na geração de um feixe de elétrons, que interage com a amostra, e ao atravessá-la sofre diferentes tipos de espalhamentos, dependentes das características dos materiais. Os elétrons que são difratados pelos planos cristalinos do material compõem o sinal formador da imagem (CORREA, 2003; OLIVEROS, 2012).

2.3.2 Espectrometria de raios X por energia dispersiva

A espectroscopia por energia dispersiva de raios X é uma técnica que fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a composição química de NPs. Nesta técnica, um feixe de luz é incidido na amostra e a partir dessa interação os raios X resultantes são detectados por meio de um detector de dispersão de energia gerando assim um espectro com sinal característico do elemento presente na amostra analisada. A partir da intensidade dos picos, é possível ainda quantificar os elementos. Essa técnica pode ser utilizada de forma

separada ou acoplada às técnicas de TEM e microscopia eletrônica de varredura (SEM - *Scanning Electron Microscopy*) (SCIMECA, et al., 2018).

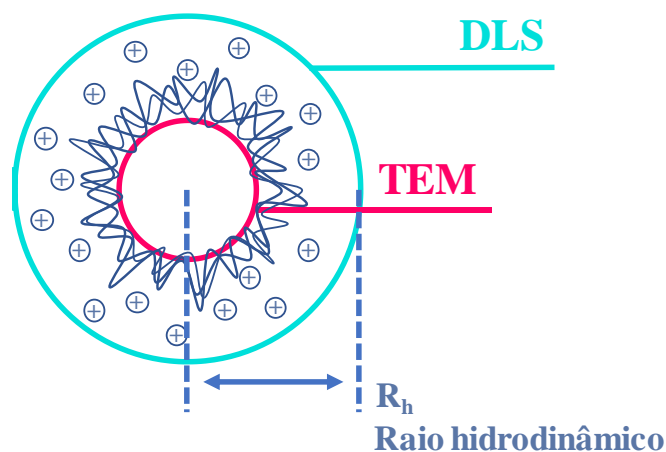
2.3.3 Espalhamento dinâmico de luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic light scattering*) é amplamente empregada na caracterização de nano e micropartículas dispersas em um líquido. Baseia-se na análise das flutuações de intensidade de luz espalhada em um determinado ângulo de dispersão, devido ao movimento Browniano (aleatório) da partícula quando é iluminada por uma fonte de luz. Estas flutuações são relacionadas com o tamanho da partícula por meio da equação de Stokes-Einstein (NOMURA et al., 2013; NAIIM et al., 2015; BHATTACHARJEE et al., 2016).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (1)$$

Diferentemente da microscopia eletrônica de transmissão, a técnica de DLS fornece o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão, levando em consideração não apenas o tamanho das partículas, mas os íons e/ou moléculas presentes nas superfícies das mesmas e em seu entorno. Dessa forma, os valores de tamanho adquiridos pela técnica de DLS geralmente são maiores que aqueles obtidos por TEM conforme ilustrado na Figura 3. Ademais, a técnica também fornece dados acerca do grau de dispersão das partículas, que implicam em sua estabilidade (BARBOSA, 2018).

Figura 3 - Ilustração da diferença de tamanho das NPs por técnicas de TEM e DLS.



Fonte: Adaptada de BARBOSA, 2018.

2.3.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR permite a medida da radiação infravermelha absorvida pela amostra. A radiação absorvida promove transições entre estados de energia vibracional das ligações químicas e, uma vez que as energias vibracionais são específicas de cada ligação, os espectros obtidos fornecem informações sobre os grupos funcionais e por sua vez a estrutura química dos compostos, permitindo verificar sua presença na superfície das NPs (BOUYANFIF, et al., 2018).

2.3.5 Espectroscopia de absorção molecular no UV-vis

A espectroscopia de absorção molecular no UV-vis é uma técnica que se baseia na absorção de radiação eletromagnética, nas regiões ultravioleta e visível do espectro, por espécies química (WORSFOLD, 2005). Por meio dessa técnica, as propriedades ópticas das NPs, como bandas de absorção e comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$).

2.4 Nanopartículas de selênio

Dentre os vários tipos de nanomateriais mencionados ao longo do texto, as NPs de selênio têm atraído atenção devido ao seu amplo espectro de aplicações biológicas (VINKOVIĆ VRČEK, 2018). O selênio é um micronutriente essencial para o crescimento e manutenção do corpo humano (QIU, et al., 2015; SKALICKOVA, 2017). Este elemento pode ser encontrado na forma inorgânica, como seleneto (-2), selenito (+4) e selenato (+6) e nas formas orgânicas, em compostos como a selenometionina (-2), metilselenometionina (-2) e selenocisteína (-2) (SAKR, KORANY, KATTI, 2018). Seus efeitos biológicos se devem essencialmente à sua presença como grupo prostético em algumas metaloproteínas. Uma das principais funções deste elemento é sua capacidade antioxidante, presente como centro redox nas proteínas glutatona peroxidase (GPx), tiorredoxina redutase-1 (TrxR-1) e selenoproteína P, desempenhando funções importantes, estimulando o sistema imune, prevenindo e/ou auxiliando no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (SIGUERO, 2016; ZHU, et al., 2017; KHURANA, et al., 2019).

Compostos como selenito de sódio, cloreto de selênio, selenato de sódio, selenometionina, selênio monometilado e selenocisteína são utilizados como suplemento nutricional, podendo atuar como agentes antioxidantes, agentes quimiopreventivos e

quimioterápicos, bem como imunomoduladores (CHEN, et al., 2015; CHHABRIA, DESAI, 2016; KHURANA, et al., 2019). Existem ainda, alguns compostos de selênio que possuem atividades antimicrobianas, a exemplo do sulfeto de selênio utilizado na fabricação de fungicidas e xampus anticaxpa (ASERE, 2013; CHHABRIA, DESAI, 2016). Por conta da sua interação com alguns metais potencialmente tóxicos, compostos contendo selênio podem ser utilizados como agentes desintoxicantes (SKALICKOVA, 2017). Além da bioatividade, também possui propriedades ópticas e semicondutoras, com aplicações industriais (OREMLAND, et al., 2004).

Selenose (altas doses de selênio) causa intoxicação, com quadro de queda de cabelo e perda das unhas, náusea, dor abdominal, diarreia e fadiga. A deficiência deste micronutriente está associada à disfunção imunológica e aumento do risco de doenças inflamatórias e cardiovasculares (SIGUERO, 2016; ZHU, et al., 2017; SAKR, KORANY, KATTI, 2018). Segundo o *Institute of Medicine* (2000), as recomendações diárias de selênio para homens e mulheres são de 55 $\mu\text{g dia}^{-1}$, e o limite máximo permitido é de 400 $\mu\text{g dia}^{-1}$ (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

As propriedades biológicas do selênio dependem da sua concentração e forma. Por exemplo, efeitos anticâncer são observados apenas em doses supranutricionais próximas aos níveis tóxicos. Uma vez que alguns compostos possuem toxicidade elevada, como o Se (IV) e o Se (VI), existe uma linha tênue entre as doses efetivas e tóxicas, limitando suas aplicações (ZHAI, et al., 2017; BOROUMAND, et al., 2019; KHURANA, et al., 2019).

Neste sentido, as nanopartículas de selênio apresentam-se como uma forma promissora de selênio, exibindo maior eficiência, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodisponibilidade, quando comparadas a outras espécies do elemento (QIU, et al., 2015; BOROUMAND, et al., 2019).

A síntese desses materiais pode ser feita por diferentes métodos, a exemplo dos já mencionados para a síntese de NPs (hidro e solvotermal, assistida por micro-ondas, por meio de eletrodeposição, por redução química, por ablação a laser e biossíntese), sendo a redução química o método mais utilizado para este tipo de material. A tabela 1 apresenta diferentes procedimentos de síntese de SeNPs baseados no método de redução química (CHHABRIA, DESAI, 2016; SKALICKOVA, et al., 2017).

Tabela 1 - Procedimentos de síntese de SeNPs pelo método de redução química.

Precursor	Agente redutor	Agente estabilizante	Tamanho (nm)	Referência
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Pectina	41	Qiu, et al., 2018
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Quitossana e carboximetilquitossana	50	Chen, et al., 2015
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Quitossana	54	Zeng, et al., 2018
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Quitossana	40-60	Lopez-Heras, et al., 2014
Selênio metálico	Polietileno glicol (PEG 200)	PEG 200	29	Zheng, et al., 2012
Ácido selenioso	Ácido ascórbico	Goma arábica	35	Kong, et al., 2014
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Álcool polivinílico (PVA) e quitossana	66 e 48	Boroumand, et al., 2019
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	PVA	50	Khalid, et al., 2016
Selenito de sódio	Glutationa	Albumina de soro bovino (BSA)	25-70	Guo, Huang, Liu, 2016
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Ovoalbumina e pectina	30 e 64	M-M, et al., 2014
Selenito de sódio	D-frutose	D-frutose	80	Vieira, et al., 2017
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Polissorbato 20	43	Bartůněk, et al., 2015
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Dextrina	20-30	Malhotra, Jha, Desai, 2014
Ácido selenioso	Borohidreto de sódio	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	31	Chauhan, Chaudhary, 2019
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	Beta-lactoglobulina	20	Zhang, et al., 2018
Selenito de sódio	Ácido ascórbico	BSA, alginato de sódioequitossana	38, 65 e 76	Cao, Xiao, Liu, 2019
Selenito de sódio	Ácido gálico	Ácido gálico	98	Dumore, Mukhopadhyay, 2020

Fonte: elaborada pela autora, 2020.

2.4.1 Uso de nanopartículas de selênio na literatura

As características únicas das SeNPs oferecem inúmeras possibilidades para aplicações biotecnológicas, de modo que o potencial desses materiais tem sido bastante explorado para finalidades terapêuticas, como atividade antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana e antidiabética, evidenciadas em diversos estudos na literatura (BAI, et al., 2017; ZHU, et al., 2017; ZENG, et al., 2018; ZENG, et al., 2019; VAHDATI, MOGHADAM, 2020). Essa versatilidade se deve em grande parte aos seus efeitos pró e antioxidantes (MATES, et al., 2019; KHURANA, et al., 2019). Em se tratando do apelo biotecnológico desses materiais, ainda existe uma carência de estudos divulgados.

A atividade antioxidante é uma propriedade bem definida das SeNPs. Kong e colaboradores (2014) observaram que, em ensaios *in vitro*, SeNPs de 35 nm, estabilizadas com goma arábica, demonstraram um alta capacidade antioxidante, em que numa concentração de 4 mg mL⁻¹ foi possível inibir mais de 80% dos radicais hidroxila e DPPH•. No estudo desenvolvido por Chen e colaboradores (2015), SeNPs estabilizadas em quitosana e em carboximetilquitosana com tamanho de aproximadamente 50 nm foram capazes de inibir mais de 80% dos radicais DPPH• e ABTS^{•+} a uma concentração de 0,6 mmol L⁻¹ e 2,0 mmol L⁻¹, respectivamente. Dumore e Mukhopadhyay (2020) sintetizaram SeNPs estabilizadas com ácido gálico, com tamanho médio de 98 nm, e obtiveram IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do radical) de 34 mg L⁻¹ para o método DPPH• e 1,38 mg L⁻¹ para ABTS^{•+}.

Segundo Zhang e colaboradores (2004), SeNPs na faixa de tamanho de 5 a 200 nm são eficientes na eliminação de espécies radicais *in vivo* e *in vitro*. Os autores realizaram ensaios *in vitro* com células de HepG2 e *in vivo* com camundongos fêmea Kuming, aplicando diferentes doses de SeNPs com intervalos de tamanho de 5 a 15 nm, 20 a 60 nm e 80 a 200 nm. De acordo com os resultados, para todos os intervalos de tamanho na mesma concentração as NPs foram absorvidas e metabolizadas pelas células HepG2 (células de hepatocarcinoma) e pelo fígado dos camundongos. Ambos foram capazes de sintetizar e induzir a atividade de enzimas contendo selênio (GPx e TrxR-1) relacionadas à homeostase redox (ZHANG, et al., 2004).

A capacidade moduladora redox desses materiais faz com que atuem de maneira eficaz contra distúrbios oxidativos (KHURANA, et al., 2019). Sua alta capacidade antioxidante pode auxiliar na prevenção e tratamento de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo, como

doenças cardiovasculares, artrite, Alzheimer e nefropatia diabética (SAKR, KORANY, KATTI, 2018).

As SeNPs têm se mostrado promissoras no tratamento contra o câncer e de acordo com Menon e colaboradores (2018), elas agem por dois principais mecanismos: apoptose e interrupção do ciclo celular, que leva ao bloqueio de outras vias, sem comprometer as células saudáveis. As células cancerígenas, diferentemente das células normais, possuem elevada acidez e encontram-se em estado de desequilíbrio redox. Dentro deste ambiente hostil as SeNPs passam a ter efeito pró-oxidante, gerando espécies reativas, que causam danos à membrana mitocondrial, e por sua vez, a apoptose das células. As SeNPs também podem retardar a sinalização para a angiogênese nas células de câncer, controlando crescimento e proliferação de modo que a incidência dessas alterações causa a interrupção do ciclo celular (KHURANA, et al., 2019).

No trabalho de Estevez e colaboradores (2014) foi feita uma comparação entre os efeitos das SeNPs estabilizadas com quitosana e outras espécies de selênio (orgânicas e inorgânicas) em células HepG2 (células de hepatocarcinoma). Os ensaios realizados mostraram que apenas as SeNPs foram capazes de interromper o ciclo celular, sem indícios de possível toxicidade em células saudáveis.

As SeNPs também podem funcionar como carreadores de fármacos no tratamento quimioterápico, devido a sua biocompatibilidade e baixa toxicidade. Jalalian e colaboradores (2018) utilizaram SeNPs funcionalizadas com polietilenimina, PEG e aptâmero 5TR1 (PEI-PEG-5TR1) para o carregamento do medicamento epirrubicina, utilizado no tratamento de câncer, e do aptâmero NAS-24, que induz a apoptose, adicionando-os à superfície das NPs. Foram realizados ensaios *in vitro*, com células HepG2, MCF-7 (carcinoma de mama humano) e células C26 (carcinoma de cólon murino) e *in vivo*, com camundongos fêmeas da espécie balb/c. As SeNPs foram eficientes no carregamento de ambas as substâncias promovendo a internalização destas nas células, e quanto aos ensaios *in vivo*, o crescimento dos tumores nos camundongos foi reduzido de forma significativa, quando comparado ao tratamento somente com epirrubicina.

Trabalhos como o de Zhu e colaboradores (2017) e El-Ghazaly e colaboradores (2017) comprovaram o potencial anti-inflamatório das SeNPs. No estudo de Zhu, as SeNPs ancoradas com polissacarídeos de algas da espécie *Ulva lactuca*, foram utilizadas para tratar

camundongos (C57BL/6J) com colite aguda induzida. A suplementação com as NPs reduziu os sintomas de colite aguda através de sua ação anti-inflamatória, suprimindo citocinas pró-inflamatórias. El-Ghazaly, em seus estudos, induziu a inflamação em ratos (Wistar), por meio de irradiação gama ou por aplicação de carragenina, as SeNPS estabilizadas com PVP (polivinilpirrolidona) foram eficazes na redução do volume do edema da pata nos ratos irradiados e não irradiados, através da regulação negativa dos genes pró-inflamatórios, juntamente com a sua atividade antioxidante, eliminando as espécies reativas formadas no processo inflamatório.

As SeNPs também têm sido associadas ao tratamento de diabetes mellitus (MATES, et al., 2019). Liu e colaboradores (2018) utilizaram SeNPs estabilizadas com polissacarídeos de *Catathelasma ventricosum* para o tratamento de camundongos (ICR) com diabetes induzida por estreptozocina (STZ) e observaram uma melhora do peso corporal, taxa glicêmica, atividades de enzimas antioxidantes e níveis lipídicos, indicando o potencial desse material, que se mostrou melhor que outras espécies de selênio.

Um comportamento semelhante foi constatado por Zeng e colaboradores (2018), que trataram camundongos com diabetes induzida com SeNPs revestidas com quitosana. Além da diminuição dos níveis de glicose e insulina no sangue e redução dos níveis lipídicos, foi verificado um aumento na atividade de enzimas responsáveis pela defesa antioxidante, resultado positivo visto que a hiperglicemia, efeito comum nesse tipo de diabetes, pode aumentar a produção de espécies reativas no organismo (ZENG, et al., 2018).

Propriedades antimicrobianas foram reportadas em SeNPs estabilizadas com polissorbato 20, que exibiram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* (BARTUŇEK, et al., 2015). Boroumand e colaboradores (2019) relataram que SeNPs estabilizadas com quitosana e PVA foram capazes de inibir o crescimento das bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus* (13 mm e 10,75 mm).

Vale destacar também, seu uso como biossensores. Wang e colaboradores (2010) e Zhang e colaboradores (2004), empregaram nanopartículas de selênio como biossensor para detecção de H_2O_2 , ambos os sensores apresentaram alta sensibilidade e limites de detecção de $8 \times 10^{-8} M$ e $9,2 \times 10^{-7} M$, respectivamente.

Kaur e Rath (2019) prepararam uma formulação tópica de proteção UV composta por probióticos, prebióticos e SeNPs para cuidados com a pele, a formulação apresentou um fator

de proteção solar (FPS) de 29,77. Os ensaios realizados demonstraram que o produto não exibiu nenhum sinal de toxicidade cutânea.

A toxicidade também é um aspecto importante a ser investigado, uma vez que determina a possibilidade de aplicação do material. Yazhiniprabha e Vaseeharan (2019) realizaram estudos para avaliar a toxicidade de SeNPs *in vitro*, utilizando macrófagos (RAW 264.7) e *in vivo*, usando náuplios de *Artemia* e observaram que apenas em concentrações de 50 µg mL⁻¹ houve ruptura célula, quanto aos ensaios *in vivo*, após um tratamento de 48 h a taxa de mortalidade observada para a maior dose foi de 3,37 %.

As propriedades mencionadas tornam esses materiais promissores, trazendo novas perspectivas no que diz respeito ao campo terapêutico, medicinal e biotecnológico e o que é imprescindível, sem que haja maiores preocupações relacionadas à toxicidade. Abrindo caminho para o desenvolvimento de diversos produtos baseados em SeNPs.

2.5 Materiais multielementares de selênio

O desenvolvimento nanotecnológico é uma crescente nos laboratórios de pesquisa, pois a Química traz uma série de possibilidades de sintetizar e estudar as características de novos materiais. Um dos artifícios utilizados para agregar e/ou potencializar propriedades a nanomateriais é a síntese de nanopartículas bi ou multielementares (WADHWAN, et al., 2016; SHARMA, et al., 2019), onde é possível sintetizar um único material constituído por mais de um elemento. Segundo Sharma e colaboradores (2019) esse tipo de material pode apresentar propriedades mais atrativas quando comparados aos materiais puros.

Essas nanopartículas podem ser sintetizadas por diferentes métodos, sendo alguns dos principais coincidentes com os das nanopartículas convencionais (puras) e já descritos anteriormente. A presença de dois ou mais elementos confere um caráter multifuncional às NPs, podendo ser utilizadas para as mais diversas aplicações, sendo as principais elétricas, ópticas, catalíticas, biomédicas e biotecnológicas (NASRABADI, et al., 2016; MAZHAR, SHRIVASTAVA, TOMAR, 2017; SHARMA, et al., 2019), o que pode ser observado de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Métodos de síntese e aplicação de nanopartículas multielementares.

Tipo de NPs	Método de síntese e estabilizante	Aplicação	Referência
Cu-Au	Biossíntese / extrato de folhas de palmeira	Atividade catalítica e antibacteriana	Al-Haddad, et al., 2020
Ag-Se	Redução química / quercetina e ácido gálico	Atividade antitumoral e antibacteriana	Mittal, Kumar, Banerjee, 2014
Cu-Ag	Eletroquímico / sem estabilizante	Atividade antibacteriana	Hung, Cong, Trang, 2019
Au-Cu/Ag-Co	Hidrotermal / polivinilpirrolidona e poliácido acrílico	Catalisadores	Yesmurzayeva, et al., 2016
Cu@Se	Solvotermal / PEG	Tratamento fototérmico e anticâncer	Liu, et al., 2020
Au-Cu _{2-x} Se	Redução química / cloreto de cetiltrimetilamônio	Propriedade óptica	Shan, et al., 2019
Au-Ag	Redução química / polivinilpirrolidona	Oxidação catalítica de glicose	Zhang, Okuni, Toshima, 2011
Cu _{2-x} Se@ZnS	Solvotermal / polivinilpirrolidona e ácido 3-mercaptopropiônico	Propriedade óptica	Wolf, et al., 2016
Ag-Au	Biossíntese / extrato de folha <i>Stigmaphyllon atum</i>	Atividade anticâncer	Elemike, et al., 2019
Cu _{2-x} Se	Redução química / Brometo de cetiltrimetilamônio	Biossensor	Gong, et al., 2020
Cu ₃ Se ₂	Redução química / glicina	Fotocatálise	Nouri, et al., 2017

Fonte: elaborada pela autora, 2020.

2.5.1 Nanopartículas de selênio-cobre

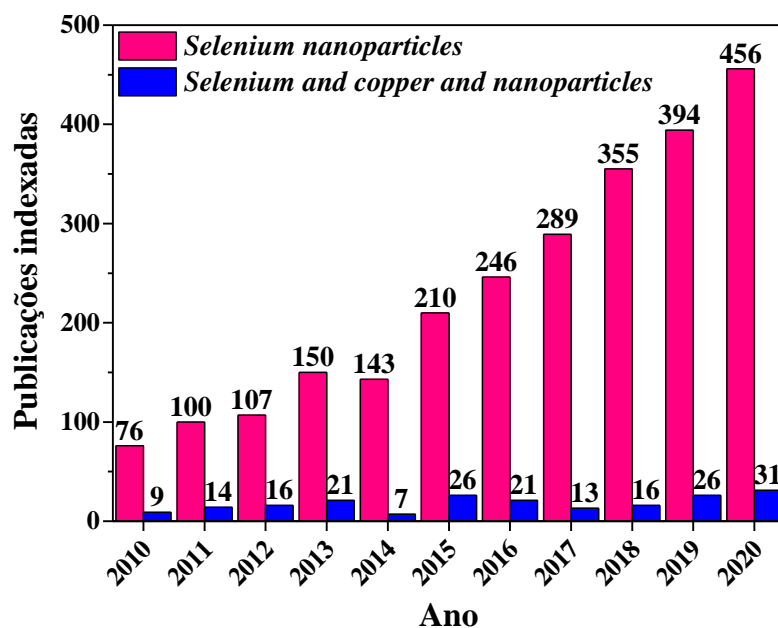
Em se tratando das SeCuNPs, o cobre foi escolhido para compor as NPs, por se tratar de um micronutriente, presente nas enzimas cuprodependentes, que regulam processos bioquímicos importantes no organismo humano (RODRIGUES, SILVA, GUERRA, 2012), tais como produção de energia, metabolismo do ferro, formação do tecido conjuntivo, funções

antioxidantes, funcionamento do sistema nervoso, dentre outras funções (COLLINS, KLEVAY, 2011). Segundo o *Institute of medicine* (2001) as recomendações diárias de cobre para um adulto são de 900 µg por dia. A deficiência deste micronutriente pode causar efeitos como, anemia, neutropenia, diarreia, fragilidade óssea, função imunológica prejudicada, tecido conjuntivo fraco, funções do sistema nervoso central prejudicadas e perda de pigmentação; quanto ao excesso, a toxicidade do cobre é bastante rara, pois os mamíferos têm um controle homeostático preciso do micronutriente, os sintomas de toxicidade aguda do cobre incluem dor abdominal, náusea, vômito e diarreia, lesão hepática grave e insuficiência renal (SHAW, 1988; COLLINS, KLEVAY, 2011).

Ademais, além das funções supracitadas para o micronutriente, nanopartículas contendo cobre têm sido associadas a propriedades antibacterianas, catalíticas, além de se mostrarem eficientes contra células de câncer e para a redução de corantes (DIN, REHAN, 2017; KHAN, JAMEEL, 2018). Visto que as SeNPs e as nanopartículas de cobre são materiais promissores, a junção das duas em um único material, pode potencializar seus efeitos, permitindo avanços, no que tange às suas aplicações.

Em comparação às SeNPs, que são bastante estudadas, ainda são poucos os trabalhos voltados para nanopartículas de selênio multielementares, em especial os que envolvem a junção de selênio e cobre, NPs utilizadas no presente trabalho. Como pode ser observado nos gráficos da Figura 4, comparando as publicações indexadas na plataforma de dados do *Web of Science* que envolvem nanopartículas de selênio nos últimos 10 anos foram encontrados 2526 artigos, enquanto que os trabalhos com nanopartículas contendo selênio e cobre são apenas 200 (busca realizada em dezembro de 2020).

Figura 4 - Gráfico do número de publicações indexadas na base de dados *Web of Science* para o período dos últimos 10 anos (2010-2020): Barras em rosa para os termos “selenium nanoparticles” e barras azuis para “selenium” AND “copper” AND “nanoparticles”.



Fonte: *Web of Science*, 2020.

É importante destacar que dentre os trabalhos que envolvem o uso de nanopartículas contendo selênio e cobre, grande parte dos estudos são voltados para a investigação de suas propriedades ópticas e ópticoeletrônicas, fotocatalisadorase o uso como biossensores (DORFS, et al., 2011; SCOTOGNELLA, et al., 2011; NOURI, et al., 2017; GONG, et al. 2020; SHITU, et al., 2020).

Vale salientar ainda que, dentre esses trabalhos alguns autores fazem uso desses materiais para revestir outros tipos de NPs, como é o caso dos trabalhos desenvolvidos por Wolf e colaboradores (2016), onde nanopartículas de sulfeto de zinco (ZnS) são revestidas por nanopartículas de Cu_{2-x}Se , e os trabalhos de Zou e colaboradores (2017) e Shan e colaboradores (2019), que fazem o uso do mesmo nanomaterial de Se e Cu para envolver NPs de ouro.

2.6 Aplicações

2.6.1 Capacidade antioxidante

O estresse oxidativo, causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo, tem sido associado a diversos fatores negativos como, envelhecimento, câncer, cardiopatias e doenças auto-imunes. Nesse sentido os antioxidantes

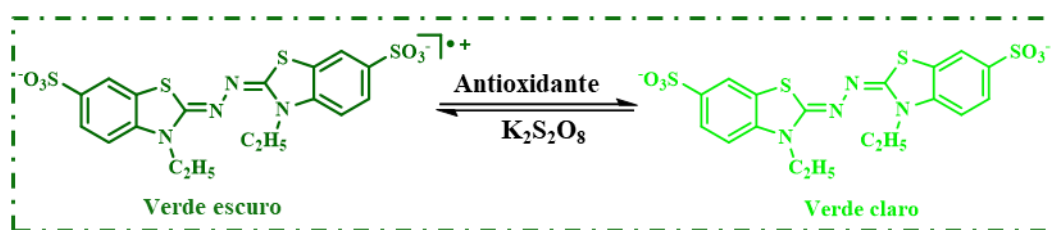
possuem o papel fundamental de combater os danos oxidativos e reestabelecer o equilíbrio redox no organismo. Os antioxidantes são espécies que em pequenas concentrações são capazes de inibir ou impedir a oxidação de biomoléculas e substratos oxidáveis (OLIVEIRA, 2016).

Existem diversos métodos para a determinação da capacidade antioxidante de amostras naturais e sintéticas, dentre os mais utilizados destacam-se os métodos colorimétricos que de forma geral, são simples, rápidos, de baixo custo, reprodutíveis e de fácil automatização. Os mecanismos podem ser baseados na reação de um radical, ou complexo oxidante com um composto antioxidante, capaz de doar átomos de hidrogênio ou elétrons (PISOSCHI, NEGULESCU, 2011).

2.6.1.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS^{•+}

Neste método, a capacidade antioxidante de uma espécie é medida pela redução do cátion radical ABTS^{•+} derivado do 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), de coloração verde escura ($\lambda_{\text{máx}} = 734 \text{ nm}$), a ABTS, de coloração verde clara, cuja intensidade diminui com o aumento da concentração do antioxidante (Figura 5). O mecanismo de ação comumente atribuído a este método é a transferência de elétrons (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005; OLIVEIRA, 2016).

Figura 5 - Reação do ABTS^{•+} em sua forma oxidada e reduzida.



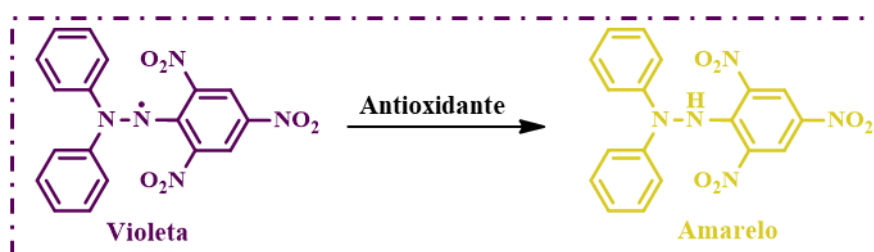
Fonte: Adaptada de OLIVEIRA, 2016.

O ABTS^{•+} é solúvel tanto em meio aquoso, quanto orgânico, permitindo a análise de compostos hidro e lipossolúveis, pode ser usado em uma ampla faixa de pH e não é afetado pela força iônica. Uma das limitações do método é o tempo para gerar o radical, que pode levar até 16 h, além da possibilidade de redução por compostos com potencial redox inferior ao seu (0,68 V), o que ocorre com alguns compostos fenólicos (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

2.6.1.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH•

O DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical nitrogenado orgânico estável, de cor violeta, que ao reagir com um antioxidante é reduzido dando origem à hidrazina de coloração amarelo claro, 2,2-difenil-1-picrilidrazina (DPPH-H). A capacidade de redução dos antioxidantes em relação ao DPPH pode ser avaliada monitorando a diminuição de sua absorvância em 515-528 nm (Figura 6). Tal reação não possui um mecanismo preferencial definido, podendo ocorrer via transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons, a depender das condições reacionais. Contudo, em meio etanólico há uma maior propensão à transferência de átomos de hidrogênio (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005; HUANG, OU, PRIOR, 2005; DAVID et al., 2010; XIAO, et al., 2020).

Figura 6 - Reação do DPPH• em sua forma oxidada e reduzida.



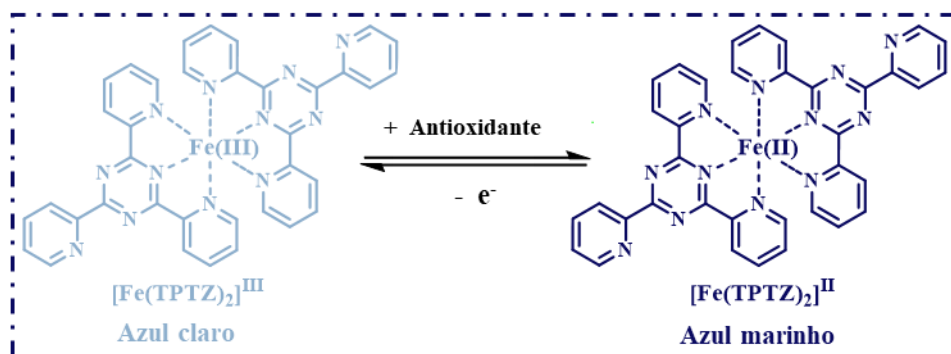
Fonte: OLIVEIRA, 2016.

Apesar de ser um método simples e bastante difundido, apresenta algumas limitações. O radical DPPH• reage de forma mais efetiva com compostos hidrofóbicos do que hidrofílicos, em virtude de sua solubilidade em meio etanólico, e pode ter a reação comprometida na presença de antioxidantes volumosos, em virtude do impedimento estérico em sua molécula (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005; OLIVEIRA, 2016).

2.6.1.3 Ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP)

O método FRAP se baseia na redução do complexo férrico 2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina (TPZ) em $\text{pH} \cong 3,6$, de $[\text{Fe}(\text{TPZ})_2]^{3+}$ para $[\text{Fe}(\text{TPZ})_2]^{2+}$, que possui coloração azul marinho (Figura 7) e $\lambda_{\text{máx}} = 593 \text{ nm}$, podendo correlacionar a quantidade/concentração de ferro reduzido com a quantidade/concentração de antioxidante (YEFRIDA, et al., 2018; XIAO, et al., 2020).

Figura 7 - Complexos férrico e ferroso característicos do método FRAP.



Fonte: Adaptada de XIAO, et al., 2020.

O método FRAP é considerado simples, rápido, barato, robusto e não requer o uso de equipamento especializado, como limitação tem a cinética de reação que pode variar de acordo com algumas classes de compostos, como é o caso de algumas moléculas mais complexas como os polifenóis (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005; HUANG, OU, PRIOR).

2.6.2 Fotoproteção

A pele, maior órgão do corpo humano e também o mais externo, é o ponto de contato direto entre o corpo e o ambiente externo, estando diariamente exposta a radiação solar ultravioleta (UV) (GUARATINI et al., 2009; ANDRADE, et al., 2020). Esta radiação pode ser dividida em três, UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm), sendo a última desconsiderada por ser absorvida pela camada de ozônio (GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, et al., 2016). A exposição à radiação UV pode trazer benefícios, como a síntese de vitamina D, estímulo à produção de melanina e bronzeamento da pele, e tratamento de contra icterícia (FLOR, DAVOLOS, CORREA, 2007, NIKOLIĆ, et al., 2011). Segundo Velasco e colaboradores (2011), as radiações UVA e UVB são responsáveis ainda, pelo equilíbrio entre a ativação e inibição dos sistemas antioxidantes cutâneos.

A exposição excessiva aos raios UV pode causar diversos tipos de danos a pele, a curto prazo os efeitos são, eritema, inflamação, edema, hiperplasia e queimaduras solares; a longo prazo os efeitos causados são mais graves, como fotoenvelhecimento, lesões cutâneas e carcinomas (ANDRADE, et al., 2020). A radiação UVA tem um comprimento de onda mais longo, penetrando profundamente nas camadas da pele, epiderme e derme, o que afeta principalmente as biomoléculas, devido à produção em excesso de espécies reativas. Em

contrapartida a radiação UVB, é a causadora dos danos imediatos, responsável pelas queimaduras, atua danificando diretamente o DNA (WILSON, MOON, ARMSTRONG, 2012; YEAGER, LIM, 2019; ANDRADE, et al., 2020).

Diante deste cenário, a fotoproteção é imprescindível para a saúde cutânea. Dentre os principais cuidados temos a busca por sombra em lugares muito expostos ao sol, o uso de roupas e acessórios de proteção, e o uso fundamental de protetores solares. Os protetores são substâncias de aplicação tópica que contenham em sua formulação ingredientes capazes de interferir na radiação solar, minimizando seus efeitos prejudiciais (GUARATINI et al., 2009; SCHALKA, REIS, 2011; YEAGER, LIM, 2019).

Os filtros UV são ingredientes presentes nos protetores e fornecem proteção contra a radiação solar ultravioleta, estes podem ser dos tipos inorgânicos e orgânicos. Os filtros inorgânicos criam uma camada na pele capaz de filtrar a radiação incidente refletindo e/ou dispersando-a, sendo os mais comuns e amplamente utilizados o dióxido de zinco (ZnO) e o dióxido de titânio (TiO₂). Já os filtros orgânicos absorvem a radiação UV e a converte em calor (SCHALKA, REIS, 2011; GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, et al., 2016). Ademais, antioxidantes também são empregados nas formulações fotoprotetoras, a fim de agir de forma sinérgica com esses produtos, auxiliando a reduzir os danos causados pelas espécies reativas geradas pela incidência da radiação (GUARATINI et al., 2009; GUIMARÃES, 2019).

O fator de proteção solar (FPS) é o principal parâmetro para determinar a eficiência de um filtro solar. O FPS corresponde à razão entre a dose eritematosa mínima (DEM) da pele com proteção do respectivo fotoprotetor e a dose eritematosa mínima da pele sem proteção, de acordo com a seguinte equação (FDA, 1978; SCHALKA, REIS, 2011):

$$FPS = \frac{DEM \text{ (pele com proteção)}}{DEM \text{ (pele sem proteção)}} \quad (2)$$

Neste caso, o FPS é determinado *in vivo*, utilizando-se voluntários com diferentes tipos de pele, que são submetidos a doses graduais de radiação. Entretanto, em virtude dos custos envolvidos nas análises *in vivo* e fatores relacionados à segurança, são realizados os testes *in vitro*. O método mais disseminado e estabelecido na literatura é o desenvolvido por Mansur e colaboradores (1986), que consiste na medida espectrofotométrica de soluções de concentração conhecida da amostra em questão, em comprimentos de onda específicos e com o auxílio de uma fórmula matemática e valores de correção experimentais é possível

relacionar os valores de absorvância com o FPS da amostra (LORCA, 2012). O FPS é calculado de acordo com a equação estabelecida por Mansur:

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (3)$$

Onde FC = fator de correção igual a 10 (FPS 4 em 8% de homossalato); $EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; $I(\lambda)$ = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; $Abs(\lambda)$ = absorvância da amostra no comprimento de onda (λ).

No Brasil o órgão que regulamenta o uso de protetores solares é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), cuja norma mais recente, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 30, lançada em 1° de janeiro de 2012, que estabelece o regulamento técnico mercosul sobre protetores solares em cosméticos, determina um FPS mínimo de 6 (ANVISA, 2012). Por outro lado, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, tem um controle mais rígido, estabelecendo um valor mínimo de 15, para fotoprotetores em loções cosméticas (FDA, 2017).

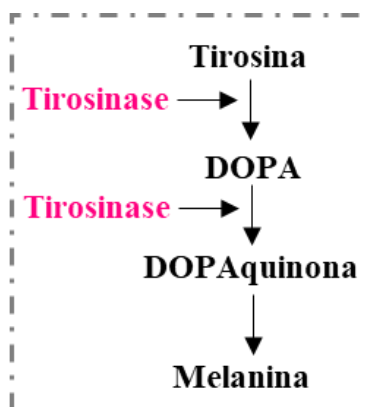
A fotoproteção é um aspecto relevante para a saúde da pele, sendo assim a busca por novas formulações fotoprotetoras com uso de diferentes filtros é de suma importância. No que diz respeito ao uso de nanopartículas com aplicações fotoprotetoras, estes são direcionados às nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco, já utilizados como filtros inorgânicos (NEWMAN, STOTLAND, ELLIS, 2009; MONTEIRO-RIVIERE, et al., 2011; BAILLO, LIMA, 2012; YEAGER, LIM, 2019; LYONS, et al., 2020). Há ainda, alguns estudos que utilizam nanocápsulas e nanocarreadores baseados em proteínas e lipídeos (NIKOLIĆ, et al., 2011; GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, et al., 2016; CASTRO, et al., 2021). Em se tratando de nanopartículas de selênio, atualmente, é encontrado apenas um artigo, já mencionado em tópicos anteriores, onde foi feita uma formulação fotoprotetora para cuidados com a pele baseada em SeNPs e probióticos e prebióticos (KAUR, RATH, 2019).

2.6.3 Inibição da tirosinase

A tirosinase é uma oxidase cuprodependente, presente em mamíferos, plantas e insetos. Possui um papel fundamental na biossíntese da melanina, catalisando a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, que por sua vez passam por uma série de reações, onde polimerizam espontaneamente (cascata da melanogênese), dando origem à melanina (Figura

8), pigmento natural que confere cor ao cabelo, pele, olhos e protege a pele dos mamíferos contra os raios UV (SILVÉRIO, CASTRO, MIRANDA, 2013, SCHALKA, DONATO, 2019).

Figura 8 - Esquema resumido do papel da tirosinase na síntese da melanina.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

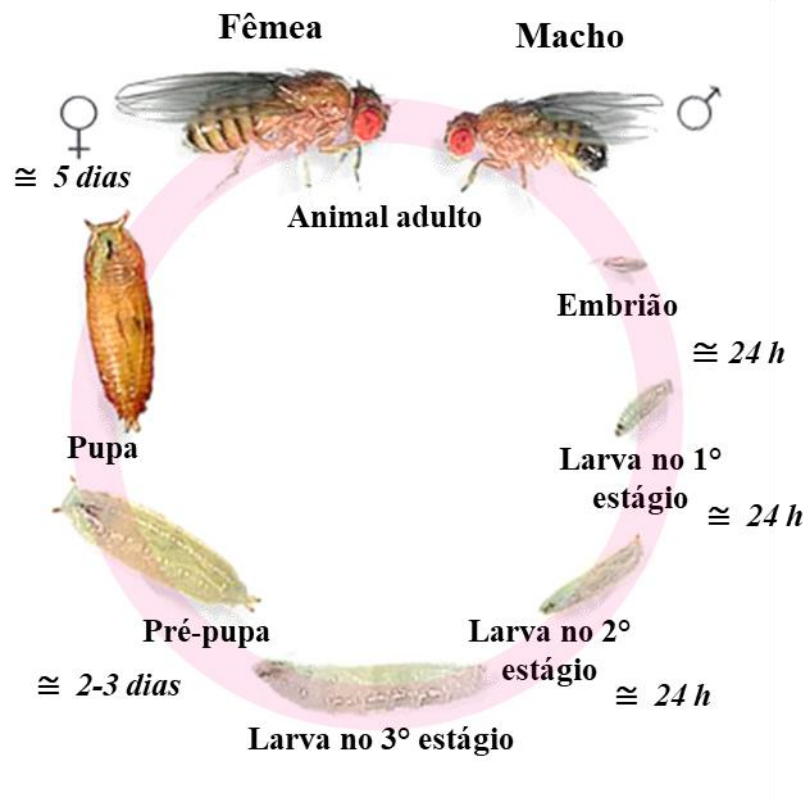
Como já mencionado, a maior exposição à radiação UV contribui com o aumento de espécies reativas, sendo assim, como mecanismo de defesa ocorre uma maior expressão de tirosinase. (RAO, et al., 2013; CARDOSO, 2014). A expressão excessiva da tirosinase está associada a diversos distúrbios dermatológicos, como: melasmas, sardas, manchas, hiperpigmentação da pele, podendo causar até distúrbios neurais como a doença de Parkinson. Além disso, a enzima também está relacionada aos processos de escurecimento de vegetais e frutas. Dessa forma, a busca por inibidores efetivos de tirosinase se faz necessária, para minimizar os efeitos negativos supracitados, com vistas a aplicações na agricultura e indústria de cosméticos (NAIRN, CRESSWELL, NAIRN, 2015; KETATA, et al., 2019; SCHALKA, DONATO, 2019, MA, et al., 2019; CHEN, et al., 2020). Do ponto de vista nanotecnológico os inibidores de tirosinase ainda são pouco explorados, havendo um vasto campo a ser explorado.

2.6.4 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Uma das preocupações com o uso de nanopartículas utilizadas para fins biotecnológicos é a toxicidade desse material. Dentre os diversos modelos para a avaliação da toxicidade *in vivo*, há o modelo de toxicidade com a espécie de mosca *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), a qual se apresenta como alternativa prática a título de obtenção e interpretação dos resultados, uma vez que este modelo possui características como

homologia dos genes para diversos tipos de doenças em humanos, ciclo biológico curto (atingindo a fase adulta em cerca de 10 dias) (Figura 9), elevada capacidade reprodutiva, fácil manutenção e ausência de imposições éticas por parte de agências regulatórias (TERNES, 2014; CUNHA, 2015).

Figura 9 - Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Adaptada de TERNES, 2014.

Experimentos que avaliam o desenvolvimento do animal desde a fase de larva até as fases pupal e adulta, revelam muito acerca da toxicidade de um determinado material.

3 JUSTIFICATIVA

Sabendo-se que materiais multielementares podem apresentar propriedades mais atrativas quando comparados aos materiais puros e que apesar das SeNPs serem bastante investigadas, estudos envolvendo nanopartículas contendo selênio e cobre ainda são limitados na literatura, a motivação para realização deste trabalho está pautada na possibilidade de sintetizar e caracterizar SeNPs e SeCuNPs em diferentes agentes estabilizantes (quitosana e PVA), avaliando propriedades pouco ou ainda não exploradas, com vista a aplicações biotecnológicas.

Estudos dessa natureza são imprescindíveis, uma vez que permitem a investigação de novas possibilidades de aplicação, bem como contribuem para a disseminação de informações acerca de propriedades pouco exploradas.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de selênio e selênio-cobre para avaliação de seu potencial fotoprotetor e antioxidante.

4.2 Específicos

- a)* Sintetizar nanopartículas de selênio (SeNPs) e nanopartículas bielementares contendo selênio e cobre (SeCuNPs), utilizando quitosana e PVA como agentes estabilizantes;
- b)* Caracterizar as SeNPs e as SeCuNPs sintetizadas, mediante as principais técnicas empregadas;
- c)* Determinar a capacidade antioxidante das SeNPs e SeCuNPs estabilizadas em quitosana e PVA;
- d)* Determinar o FPS das nanopartículas em modelo *in vitro*;
- e)* Realizar estudos de inibição da tirosinase com as nanopartículas sintetizadas;
- f)* Avaliar a toxicidade das NPs *in vivo*, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo.

5 EXPERIMENTAL

5.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico de pureza, não sendo necessária qualquer purificação adicional. As soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade elétrica $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) e resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, obtida a partir do purificador de água Master System MS2000, Gehaka (São Paulo, SP, Brasil). Diluições subsequentes das soluções foram efetuadas quando necessárias, utilizando a mesma água.

Para a síntese das nanopartículas, foram preparadas soluções aquosas de selenito de sódio (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) e sulfato de cobre penta-hidratado (Vetec, RJ, Brasil) nas concentrações de 27 e 50 mmol L^{-1} ; soluções de ácido ascórbico (Synth, SP, Brasil) 100 e 230 mmol L^{-1} ; ácido acético $2,4 \text{ mol L}^{-1}$, a partir da diluição do ácido acético glacial (Vetec, RJ, Brasil); quitosana (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) em ácido acético 3,5 % (v v⁻¹) e PVA (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) 20 mg mL^{-1} , em meio aquoso.

Brometo de potássio (KBr) (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) foi utilizado para confecção das pastilhas e posteriores análises de FTIR.

Soluções estoque (100 mg L^{-1}) foram preparadas para uso nos métodos de avaliação da capacidade antioxidante. O ácido ascórbico, o trolox® (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico e o selenito de sódio foram solubilizados em água ultrapura e a quercetina (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) foi preparada em meio etanólico (Dinâmica, SP, Brasil).

A solução estoque do radical derivado ABTS^{•+} 5 mmol L^{-1} , foi preparada a partir do 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6- sulfônico (ABTS^{•+}) (Merck, DA, Alemanha) e persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Merck, DA, Alemanha) numa proporção de (6:1) em água ultrapura. A solução foi incubada por 16 h ao abrigo da luz e, em seguida, diluída para o volume final com tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com ajuste de pH para $7,4 \pm 0,1$ (OLIVEIRA, 2016).

A solução do radical DPPH[•] (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) $600 \mu\text{mol L}^{-1}$, foi preparada mediante solubilização do reagente em metanol (Dinâmica, SP, Brasil) (OLIVEIRA, 2016).

A solução do reagente FRAP foi preparada a partir da mistura de três soluções: tampão acetato ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3,6 \pm 0,1$), 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) (10 mmol L^{-1}) e FeCl_3 (20 mmol L^{-1}) (ambos Merck, DA, Alemanha), numa proporção de 10: 1: 1 (v/v) (YEFRIDA, et al., 2018).

A solução estoque do padrão 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BZF-3) (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) foi preparada em etanol p.a. (Dinâmica, SP, Brasil).

Todas as soluções estoque de tirosinase, dopamina (cloridrato de dopamina), L-DOPA (3,4-dihidroxil-fenilalanina) e ácido kójico foram preparadas a partir da dissolução desses reagentes em tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,8 \pm 0,1$.

5.2 Materiais e equipamentos utilizados

Para as medidas de pH utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro PG 2000, Gehaka (São Paulo, SP, Brasil) com incerteza de $\pm 0,01$. As massas dos padrões e reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica AG 200, Gehaka (São Paulo, SP, Brasil) com precisão de 0,1 mg.

A síntese e diálise das nanopartículas foram realizadas sob agitação, utilizando agitador magnético modelo GT-AMB2L, Global equipamentos (Monte Alto, SP, Brasil). Para a diálise das suspensões contendo os nanomateriais sintetizados, utilizou-se membrana de celulose de 12 kDa, D9652-100FT (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha), a diálise foi efetuada contra água ultrapura.

Para avaliar o tamanho e características morfológicas das nanopartículas, utilizou-se as técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), empregando analisador de tamanho de partícula Zetatrac NPA 152-31, Microtrac (Montgomeryville, PA, USA), com uma cuba interna equipada com duas sondas ópticas com capacidade de 0,7 - 3 mL de amostra e faixa de tamanho detectável entre 0,8 e $6,5 \mu\text{m}$; e microscopia eletrônica de transmissão (TEM), utilizando dois microscópios: (i) modelo JEM-1400 (Plus), Jeol (Peabody, MA, USA) e (ii) microscópio eletrônico de alta resolução JEM 3000F, Jeol (Peabody, MA, USA), acoplado ao sistema de microanálises por EDX, INCAEnergy⁺, Oxford Instruments (Concord, MA, USA), para determinar a composição elementar das NPs em termos de Se e Cu. As amostras analisadas por TEM foram preparadas em *grids* de níquel.

A composição superficial das nanopartículas, em termos de grupos funcionais, foi verificada por meio dos espectros de absorção na região do infravermelho, adquiridos

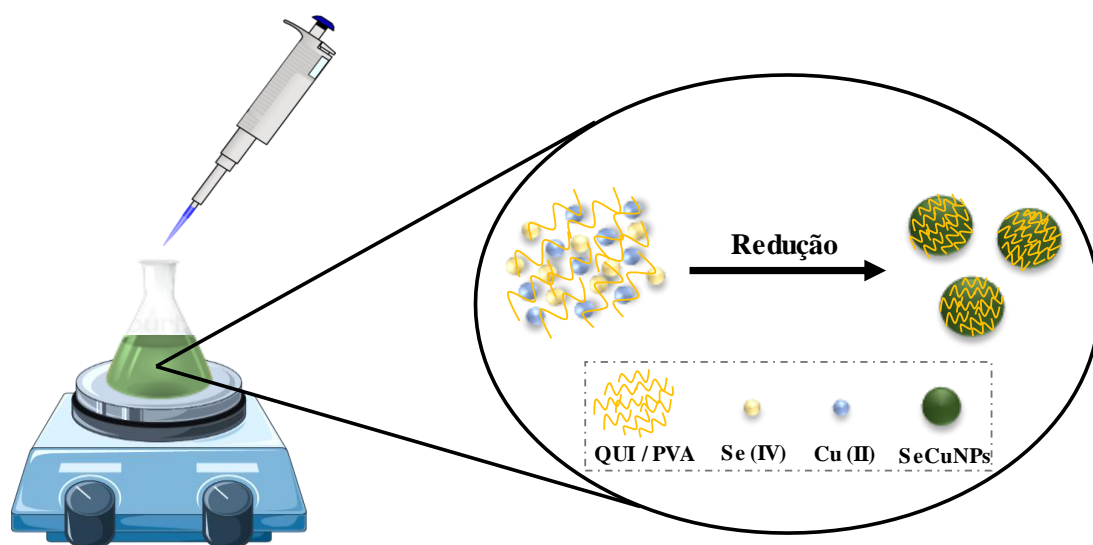
utilizando espectrofotômetro de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier modelo Nicolet IR 200, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

As medidas espectrofotométricas na região UV-Vis foram realizadas em dois modelos de espectrofotômetro, nomeadamente UV-2600, Shimadzu (Barueri, SP, Brasil) e AJX-6100PC, Micronal (São Paulo, SP, Brasil), equipados com cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico e capacidade de 4,0 mL.

5.3 Síntese das nanopartículas

As sínteses de SeNPs e SeCuNPs foram realizadas com base em procedimentos já estabelecidos na literatura, devidamente adaptados, os quais faziam uso de diferentes agentes estabilizantes, quitosana e PVA (Figura 10).

Figura 10 - Esquema geral de síntese das nanopartículas bielementares (SeCuNPs).



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Para sintetizar as SeNPs estabilizadas com quitosana, utilizou-se como base a metodologia estabelecida por Bai e colaboradores (2008). O procedimento consiste na adição de uma alíquota de 1 mL de solução de Se (IV) 24 mmol L^{-1} a um erlenmeyer contendo 4 mL de solução de quitosana 0,5% (m v^{-1}), 3 mL de solução de ácido ascórbico (230 mmol L^{-1}) e 2 mL da solução de ácido acético ($2,4 \text{ mol L}^{-1}$), sob agitação. No caso das SeCuNPs, há uma etapa final em que é adicionada uma solução de Cu (II) também na concentração de 27 mmol L^{-1} .

A síntese de SeNPs funcionalizadas com PVA está pautada na metodologia descrita por Khalid e colaboradores (2016), na qual uma solução de selenito de sódio (50 mmol L^{-1}) e uma solução de PVA 20 mg mL^{-1} , foram misturadas em uma proporção de volume 1:1 ($v v^{-1}$). Em seguida, sob agitação, acrescentou-se uma solução de ácido ascórbico (100 mmol L^{-1}), numa proporção 3:20 ($v v^{-1}$). Com relação à síntese das SeCuNPs, foi feita ainda a adição de uma solução de sulfato de cobre (50 mmol L^{-1}) na última etapa. As suspensões de NPs foram mantidas sob agitação à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas para a redução completa do selenito pelo ácido ascórbico para produzir o Se elementar.

Após a síntese, as soluções contendo as nanopartículas foram dialisadas durante 8 h, para remover o excesso de reagentes, especificamente os ácidos (ascórbico e acético). As membranas de diálise foram hidratadas em água ultrapura durante 15 min, em seguida, as suspensões das NPs foram transferidas para as membranas, que foram devidamente vedadas e dispostas em béqueres com 2 L de água ultrapura. A cada 4 horas a água de diálise foi trocada, além disso, também foram feitas medidas de pH antes e após a síntese, para confirmar a remoção dos ácidos.

5.4 Caracterização das nanopartículas

Para a caracterização das NPs, as técnicas utilizadas foram, nomeadamente: microscopia eletrônica de transmissão (TEM); espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDX); espalhamento dinâmico de luz (DLS); espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); espectroscopia de absorção molecular no UV-vis. Essas análises foram realizadas em parceria com o laboratório de Química Bioanalítica (QBA) da Universidade Complutense de Madrid (UCM) - Espanha, o Grupo de Catálise e Reatividade Química (GcaR) do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

5.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão das NPs foram realizadas nas dependências do Centro de Apoio à Investigação (CAI) de microscopia eletrônica da Universidade Complutense de Madrid - Espanha (UCM) devido a uma parceria estabelecida com o professor José Luis Luque-García. A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada, a fim de investigar o tamanho médio e forma do material. O preparo da amostra envolveu gotejamento de 2 a 3 gotas da suspensão de NPs sobre um *grid* de níquel, revestidos

com filme de carbono e depositados sobre papel absorvente para absorção do excesso da solução. Após a secagem sob condições ambiente por cerca de 5 min, os *grids* foram inseridos no porta-amostra e, em seguida, no equipamento sob vácuo. De posse das imagens geradas, foi possível calcular a média de tamanho de partículas mediante medida individual de um grupo de NPs presente em cada foto ($N \approx 60$), com o auxílio do programa ImageJ, versão 1.46r, Java.

5.4.2 Espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDX)

A presença dos constituintes das SeNPs e SeCuNPs, foi investigada através da técnica de espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDX - *Energy Dispersive X-ray*). As análises foram realizadas juntamente com as análises de microscopia eletrônica de transmissão, uma vez que os equipamentos de TEM utilizados são acoplados ao EDX.

5.4.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para verificar a distribuição e tamanho do raio hidrodinâmico das nanopartículas sintetizadas, as amostras foram previamente preparadas pela diluição de 20 μL das nanopartículas em 10 mL de água ultrapura, e posteriormente submetidas às análises.

5.4.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A fim de investigar as possíveis interações entre as SeNPs e SeCuNPs e os polímeros estabilizantes utilizados (quitosana e PVA), bem como determinar a presença dos grupos funcionais em sua superfície, foram registrados espectros de FTIR. As amostras das nanopartículas (SeNPs_QUI, SeNPs_PVA, SeCuNPs_QUI, SeCuNPs_PVA) e dos agentes estabilizantes foram preparadas gotejando suas respectivas suspensões em brometo de potássio (KBr), o qual foi seco em estufa a 70° C, logo após, as pastilhas contendo o sal e as amostras foram preparadas, e as análises foram realizadas. A faixa espectral abrangida para todas as análises foi de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

5.4.5 Espectroscopia de absorção molecular no UV-vis

Para avaliar as propriedades ópticas das NPs, os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível foram obtidos mediante varredura no intervalo de 200 a 1000 nm para as NPs, utilizando as soluções dos respectivos estabilizantes como referência. Para as análises,

foram feitas diluições utilizando-se 500 μL das amostras e estabilizantes para um volume final de 10 mL, ajustado com água ultrapura.

5.5 Aplicações biotecnológicas de SeNPs e SeCuNPs

Sabe-se que as NPs contendo selênio possuem uma série de possibilidades de aplicações biotecnológicas. Dessa forma, foram realizados alguns experimentos, a fim de avaliar as propriedades desses materiais, em especial as propriedades pouco ou ainda não exploradas. Dentre elas, atividade antioxidante, o fator de proteção solar, a inibição da tirosinase, toxicidade utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo. Os ensaios com modelo animal foram realizados em colaboração com o Laboratório de Análise in vivo da Toxicidade (Lavitox).

5.5.1 Avaliação da capacidade antioxidante de SeNPs e SeCuNPs

Neste estudo foram aplicados métodos baseados em diferentes mecanismos reacionais, ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP, a fim de avaliar a capacidade antioxidante das nanopartículas, bem como o mecanismo de ação preferencial das mesmas. Dentre os antioxidantes padrões comumente utilizados para a comparação dos resultados, foram selecionados padrões com diferentes classes e graus de hidrofobicidade: ácido ascórbico (reduzidor, hidrofílico), trolox® (composto fenólico, hidrofobicidade intermediária) e quercetina (flavonóide, lipofílico).

5.5.1.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS^{•+}

Para o ensaio do sequestro do radical ABTS^{•+} adicionou-se 88 μL da solução estoque do radical ABTS^{•+} (5 mmol L⁻¹) em um tubo eppendorf de 2 mL e diferentes volumes das soluções padrão ou amostras. Os tubos foram avolumados com água deionizada e após 15 min da mistura dos reagentes procedeu-se a medida espectrofotométrica em $\lambda = 734 \text{ nm}$, empregando-se cubetas de vidro com 10 mm de caminho óptico (GRANJA et al., 2016). O sinal de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, no entanto, a amostra foi substituída por água deionizada. As nanopartículas foram analisadas em uma faixa de concentração de 0,05 a 0,6 mg L⁻¹ e os padrões (ácido ascórbico, trolox e quercetina) variaram de 0,1 a 3,0 mg L⁻¹.

Para a determinação da capacidade antioxidante foram construídas curvas analíticas em triplicata a partir da variação do percentual de inibição em função da concentração das

nanopartículas e dos padrões ($\%I = aC_{AO} + b$). O $\%I$ foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\%I = \left(1 - \left(\frac{A_{AO}}{A_{ref}} \right) \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde, $\%I$ corresponde à porcentagem de inibição, A_{AO} à absorvância do antioxidante e A_{ref} à absorvância do branco (GRANJA et al., 2016). Os resultados foram expressos em função do IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% do radical empregado ou gerado), tendo como unidade $mg L^{-1}$.

5.5.1.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH•

Para a realização do ensaio de sequestro do radical DPPH•, procedeu-se de forma semelhante ao ABTS•+. Em tubos eppendorf de 2 mL foram adicionados 100 μL da solução metanólica do radical DPPH• ($600 \mu mol L^{-1}$) e diferentes volumes das soluções padrão ou amostras. O volume foi ajustado com uma solução etanólica 30% (v/v). Aguardou-se 30 min e a medida espectrofotométrica foi realizada em $\lambda = 527 \text{ nm}$. O sinal de referência (branco) foi obtido substituindo as amostras ou padrões pela solução etanólica (OLIVEIRA, 2016). As NPs foram analisadas em uma faixa de concentração de 0,05 a 0,8 $mg L^{-1}$ e os padrões (ácido ascórbico, trolox® e quercetina) variaram de 0,1 a 3,0 $mg L^{-1}$. Assim como no método do ABTS•+, a determinação da capacidade antioxidante foi realizada a partir da construção de curvas analíticas, das NPs e dos padrões em triplicata e os valores foram expressos em função do IC_{50} (em $mg L^{-1}$).

5.5.1.3 Ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP)

Além de avaliar a capacidade inibição de espécies radicalares, foi feita a avaliação do potencial de redução de ferro das NPs. Para tanto, utilizou-se a metodologia estabelecida por Yefrida e colaboradores (2018), ajustando os volumes dos reagentes para um $V_{final} = 2 \text{ mL}$. Em um tubo adicionou-se 400 μL da solução do reagente FRAP (contendo $FeCl_3$ 20 $mmol L^{-1}$, TPTZ 10 $mmol L^{-1}$ e tampão de acetato 0,3 $mol L^{-1}$, $3,6 \pm 0,1$) e diferentes volumes das soluções padrão ou amostras. O volume foi ajustado com água ultrapura e, após 10 min, procedeu-se com as medidas espectrofotométricas em $\lambda = 593 \text{ nm}$, utilizando cubeta de vidro com 10 mm de caminho óptico. O sinal de referência (branco) foi obtido a partir de uma solução semelhante à anterior, em que a amostra foi substituída por água deionizada. As NPs

foram analisadas em uma faixa de concentração de 1,0 a 4,0 mg L⁻¹ e os padrões (ácido ascórbico, trolox® e quercetina) variaram de 0,25 a 10 mg L⁻¹. Foram construídas curvas analíticas, em triplicata, resultantes do sinal de absorvância em função da concentração dos antioxidantes, com no mínimo cinco pontos para cada amostra ou padrão.

5.5.2 Fator de Proteção Solar UVB *in vitro*

Sabe-se que as SeNPs possuem capacidade antioxidante já estabelecida (ZHAI, et al., 2017; KHURANA, et al., 2019) e que tais características são relevantes no que diz respeito à proteção solar. Dessa maneira, para determinar o FPS na região UVB *in vitro*, as nanopartículas foram avaliadas e comparadas frente ao padrão 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BZF-3), composto fotoprotetor presente em formulações comerciais (ARAÚJO, et al., 2014). Inicialmente, foram realizados testes preliminares, com o intuito de verificar a faixa linear ideal (que obedecesse à Lei de Beer) para realização das medidas. Assim, o BZF-3 e as NPs foram solubilizados e diluídos utilizando etanol como solvente e, em seguida, realizou-se medidas de varredura em λ de 260 a 400 nm, regiões de absorção UVA e UVB, empregando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico. Assim, construiu-se uma curva analítica das NPs e do padrão em uma faixa de concentração de 1 a 30 mg L⁻¹. A linearização dos resultados foi feita utilizando o $\lambda_{\text{máx}}$ do BZF-3 (329 nm), uma vez que o comprimento de onda de máxima absorção das NPs não encontra-se na faixa avaliada. A partir das curvas analíticas foram determinadas as concentrações utilizadas para o cálculo de FPS (ARAÚJO, et al., 2014; GUIMARÃES, 2019).

Posteriormente, o composto padrão e as nanopartículas nas concentrações definidas, 20 e 30 mg L⁻¹, foram avaliados em triplicata, na faixa de 260 a 400 nm. O FPS foi determinado mediante a equação (MANSUR, et al., 1986):

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (5)$$

Onde FC = fator de correção igual a 10 (FPS 4 em 8% de homossalato); $EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; $I(\lambda)$ = intensidade da luz solar

no comprimento de onda λ ; $Abs(\lambda)$ = absorvância da amostra no comprimento de onda (λ). Os valores de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda da região UVB.

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fonte: Adaptada de NASCIMENTO, et al., 2013.

5.5.3 Inibição da tirosinase

Visto que as nanopartículas apresentaram atividade fotoprotetora, realizou-se o ensaio para avaliar o potencial desses materiais enquanto inibidores de tirosinase, por se tratar de uma enzima associada à síntese de pigmentos que protegem a pele da radiação UV. O estudo de inibidores da tirosinase foi realizado com base nas metodologias descritas por Souza-Pereira e colaboradores (2018) e Ketata e colaboradores (2019), utilizando tirosinase (Sigma-Aldrich, HE, Alemanha) extraída de fungo. Em tubos eppendorf de 2 mL adicionou-se um volume 37,2 μ L de tirosinase (20 unidades) e diferentes volumes dos inibidores, neste caso, as NPs e o ácido kójico, inibidor padrão de tirosinase. A mistura foi homogeneizada e após cerca de 1,5 min acrescentada ao substrato L-DOPA realizando ajustes dos volumes para que a concentração final fosse 0,5 mmol L⁻¹, o volume final da mistura 1 mL foi ajustado com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,8 \pm 0,1.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas logo após a adição do substrato e do tampão, em $\lambda = 475$ nm (comprimento de onda de máxima absorção do dopacromo, intermediário da melanina), a cada 5 s durante 25 min, tempo de saturação. A referência (controle) foi obtida pela medida da mistura dos reagentes sem o inibidor ajustando o volume com tampão, no caso das NPs, utilizou-se os estabilizantes, uma vez que não apresentaram qualquer inibição. As nanopartículas foram também medidas na presença do tampão, pois

apresentaram sinal de absorção no λ avaliado e os valores foram descontados do sinal obtido no ensaio. O efeito do ácido kójico foi avaliado numa faixa de 1,25 a 10 mg L⁻¹ e o das NPs numa faixa de concentração 1,25 a 50 mg L⁻¹. A inibição das enzimas foi medida pela equação descrita abaixo, e os resultados foram expressos na forma de IC₅₀.

Cálculo de inibição:

$$\%I = \frac{[(R_{25min} - R_{0min}) - (A_{25min} - A_{0min})]}{(R_{25min} - R_{0min})} \times 100 \quad (6)$$

Onde, $\%I$ é a porcentagem de inibição, R_{25min} a absorvância da referência em 25 min, R_{0min} a absorvância da referência em 0 min, A_{25min} a absorvância da amostra em 25 min e A_{0min} a absorvância da amostra em 0 min.

5.5.4 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Para avaliar os efeitos da exposição às NPs no desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*, larvas do primeiro estágio foram transferidas para 4 mL do meio de cultura padrão (composto por água, fubá, açúcar, fermento e metil-fidroxibenzoato) contendo NPs e estabilizantes em diferentes concentrações (0,1; 1,0; 10 e 50 mg L⁻¹, no caso dos estabilizantes as concentrações em se encontravam nas NPs), para o controle foi adicionado apenas o meio aos tubos. Os experimentos foram realizados em quadruplicata com n= 30 larvas por repetição, as larvas foram acompanhadas por aproximadamente 15 dias, observando o número de pupas, a taxa de emergência e o tempo de desenvolvimento larval e pupal.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese das nanopartículas

Tendo sido realizada a síntese, a formação das nanopartículas em seus respectivos agentes estabilizantes foi visualizada através da mudança de coloração, como pode ser observado na Figura 11. As SeNPs possuem coloração laranja avermelhado (Figura 11b e 11d), conforme tem sido relatado na literatura (RAMAMURTHY, et al., 2013; KONG, et al., 2014; ZHANG, et al., 2015; XIAO, et al., 2017; SINGH, et al., 2019). As SeCuNPs possuem coloração verde escuro (Figura 11a e 11c), assim como observado no trabalho de Gong colaboradores (2020) e Shan e colaboradores (2019).

Figura 11 - Fotografia das soluções de nanopartículas: a) SeCuNPs_QUI, b) SeNPs_QUI, c) SeCuNPs_PVA e d) SeNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Notou-se ainda, visualmente, que não houve variação na coloração das suspensões de SeNPs e SeCuNPs em função dos diferentes estabilizantes (quitosana e PVA) uma vez que

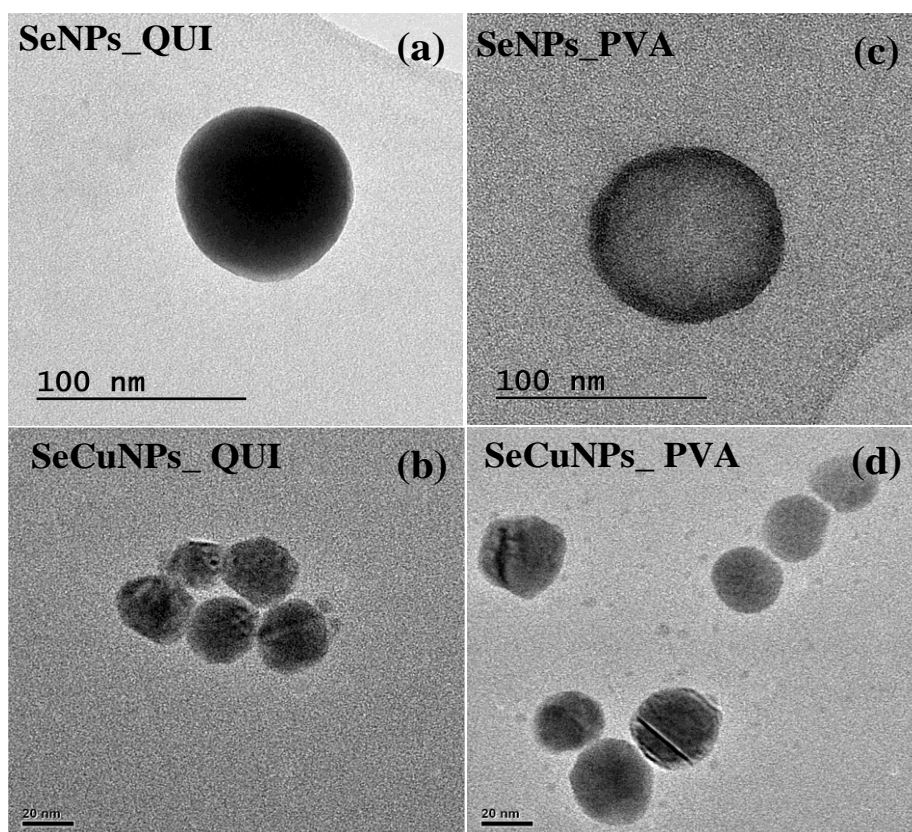
além das concentrações serem equivalentes, as colorações se devem às NPs e não aos estabilizantes (BAI, et al., 2008; KHALID, et al., 2016).

6.2 Caracterização das nanopartículas

6.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão

De acordo com as imagens de TEM, as nanopartículas mono e bielementares, em ambos estabilizantes, possuem formato esférico e distribuição uniforme de tamanho. As SeNPs estabilizadas em quitosana e PVA possuem um tamanho médio de partícula de 94 nm e 78 nm (Figura 12a e 12c), respectivamente, verificando-se que a mudança do agente estabilizante causa uma ligeira alteração no tamanho. Em contrapartida, as SeCuNPs_QUI e as SeCuNPs_PVA possuem tamanhos médios similares, de 36 nm e 35 nm (Figura 12b e 12d), respectivamente. Para essas NPs o tamanho não sofre influência dos estabilizantes empregados.

Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Comparando as nanopartículas bielementares e puras, é possível verificar que, a presença de outro elemento, neste caso o cobre, promoveu uma diminuição no tamanho do material, fazendo com que as nanopartículas SeCuNPs tenham um tamanho de partícula médio menor em comparação às SeNPs nos dois estabilizantes (quitosana e PVA), porém, sem alterar a forma das NPs que se manteve esférica.

Embora o mecanismo pelo qual ocorre a diminuição de tamanho não esteja elucidado, alguns autores têm reportado esse comportamento ao adicionar outros elementos à síntese. Nenavathu, Sharma e Dutta (2018), constataram uma diminuição de aproximadamente 50% do tamanho das NPs de óxido de zinco ao acrescentar 5 % de selênio. Tal diminuição de tamanho além de aumentar o *band gap*, diminuindo os comprimentos de onda de absorção e emissão, também aumentou a área superficial induzindo a uma alta eficiência catalítica para a degradação do colesterol.

Alguns outros autores realizaram tal procedimento e obtiveram o mesmo comportamento. Shayesteh e Dizgah (2013) ao sintetizar nanopartículas de óxido de zinco, verificaram uma redução de tamanho gradual, conforme o aumento da concentração de Mg adicionado. Kumar e colaboradores (2019) acrescentaram níquel durante a síntese de nanopartículas de sulfeto de zinco e notaram uma diminuição de 17 para 11 nm. Semelhantemente, El-Hagary e colaboradores (2019) ao adicionar 0,08% de Fe nas nanopartículas de óxido de cério observaram uma diminuição de 20 para 14 nm. Nesses estudos, as propriedades ópticas dos materiais sofreram influência devido à redução de tamanho.

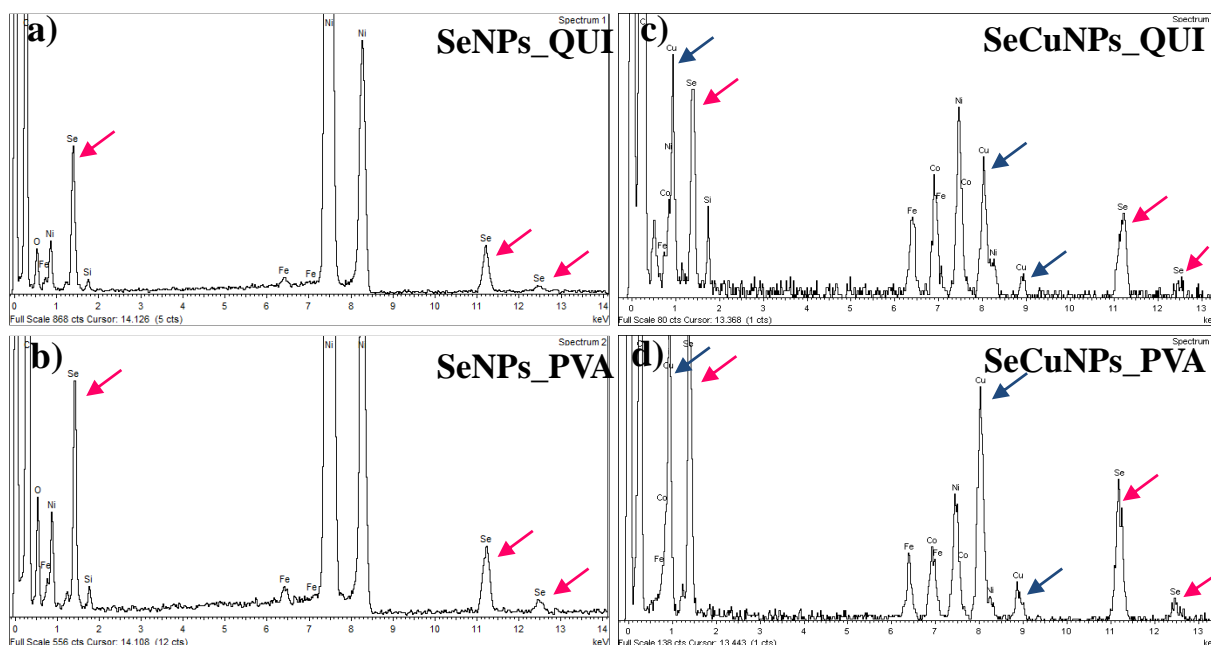
Assim como nas sínteses supracitadas, na síntese proposta a presença de dois precursores ao invés de um (Se e Cu) para gerar as NPs influenciou seus processos de formação devido às interações entre os elementos, podendo haver afetado desde a nucleação, onde os núcleos iniciais são formados, até a etapa final de crescimento, na qual os aglomerados se agregam para formar as NPs (ASERE, 2013).

6.2.2 Espectrometria de raios X por energia dispersiva

Juntamente às análises de TEM foram realizadas as análises de EDX, para confirmar a presença dos elementos de interesse nas Nps produzidas. De acordo com os gráficos de EDX, nas SeNPs_QUI e SeNPs_PVA, constatou-se a presença de selênio (Figura 13a e 13b), indicado pelas setas rosas. Para as SeCuNPs_QUI e SeCuNPs_PVA (Figura 13c e 13d),

observa-se a presença de ambos elementos (Se e Cu), sendo o cobre indicado pelas setas azuis.

Figura 13 - Espectro de EDX das nanopartículas: a) SeNPs_QUI, b) SeNPs_PVA, c) SeCuNPs_QUI e d) SeCuNPs_PVA.

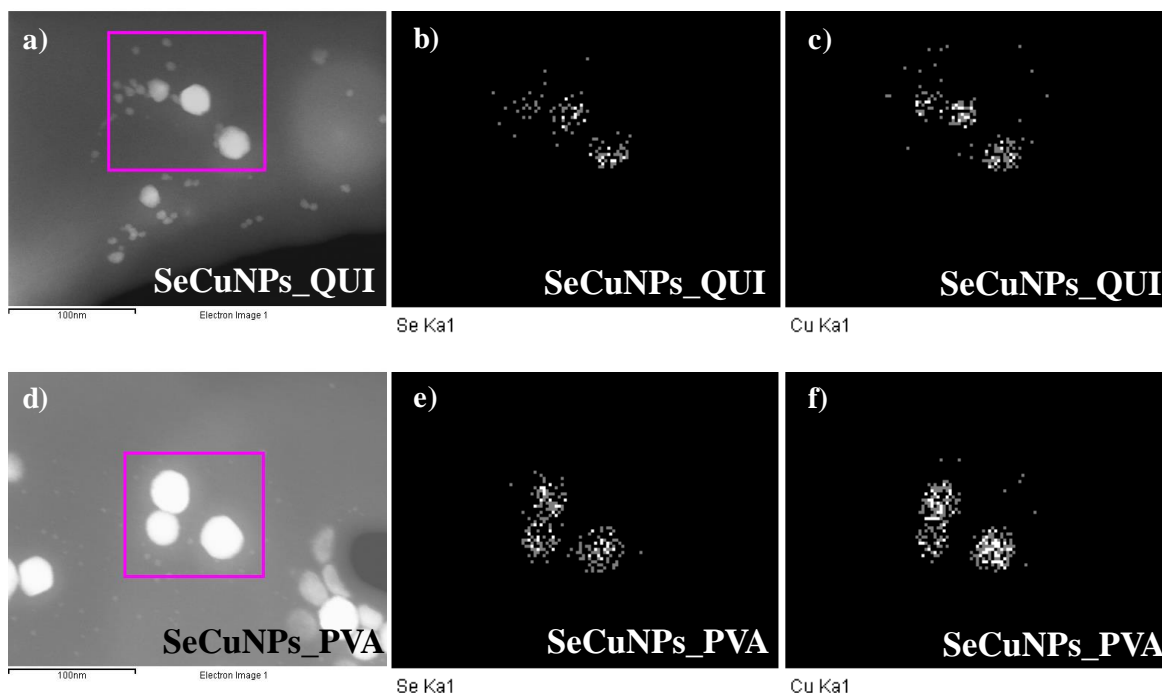


Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Os sinais característicos do Se encontrados foram semelhantes aos encontrados por Chen e colaboradores (2015) e Cavalu e colaboradores (2018) ao caracterizar SeNPs. Também foram observados ainda, alguns sinais de C e O, devido aos resquícios dos agentes estabilizantes (quitosana e PVA) presentes nas NPs. Com relação às NPs bielementares, a proporção de Se e Cu nesses materiais (SeCuNPs_QUI e SeCuNPs_PVA) é de aproximadamente 50% de cada um dos elementos, indicando uma proporção Se:Cu de 1:1 na NP, e os sinais referentes ao Cu são condizentes com dados da literatura para materiais contendo este elemento (XIONG, et al., 2011; KHAN, et al., 2018; MALI, RAJ, TRIVEDI, 2019). Vale salientar que, os picos de Ni e Fe, são oriundos do *grid* e da estrutura metálica do próprio equipamento.

Adicionalmente, para avaliar a distribuição do Se e Cu nas NPs bielementares, foi feito um mapeamento químico, indicando em quais regiões de cada nanopartícula os elementos encontram-se presentes, conforme as imagens apresentadas na Figura 14.

Figura 14 - Mapeamento químico das nanopartículas sintetizadas: a) imagem de TEM das SeCuNPs_QUI, b) mapeamento de selênio nas SeCuNPs_QUI, c) mapeamento de cobre nas SeCuNPs_QUI, d) imagem de TEM das SeCuNPs_PVA, e) mapeamento de selênio nas SeCuNPs_PVA e f) mapeamento de cobre nas SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

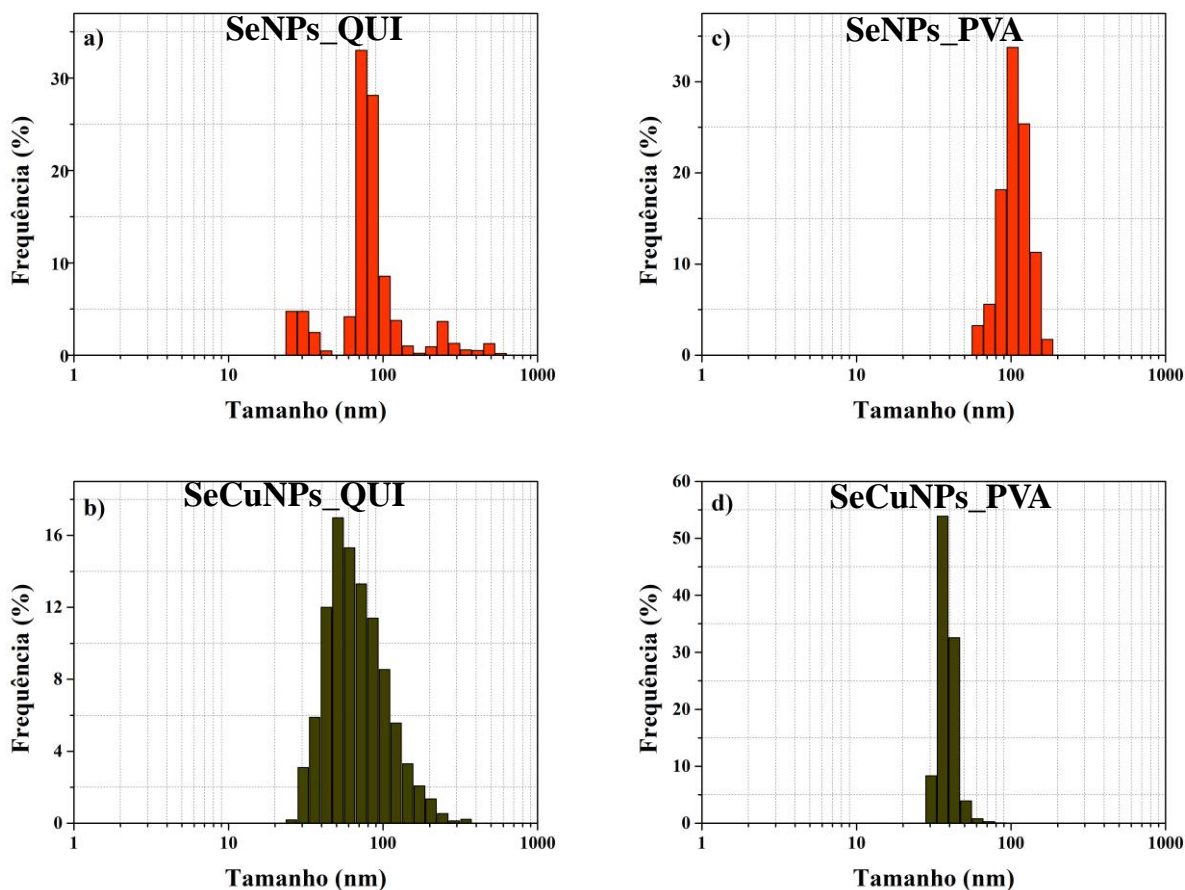
De acordo com o mapeamento químico das nanopartículas bielementares, verifica-se que tanto nas SeCuNPs_QUI (Figura 14a, 14b e 14c), quanto nas SeCuNPs_PVA (Figura 14d, 14e e 14f), cobre e selênio encontram-se distribuídos de maneira uniforme sobre toda a nanopartícula, comprovando que se trata de um nanomaterial bielementar, composto por ambos elementos. Outrossim, por meio do mapeamento é possível constatar a proporção equivalente de selênio e cobre nos materiais a qual é de 1:1, como já mencionado anteriormente.

6.2.3 Espalhamento dinâmico de luz

Conforme os histogramas de DLS, pode-se observar que as NPs apresentam uma distribuição uniforme de tamanho, bem como foi observado nos dados de TEM. As

SeNPs_PVA exibem raio hidrodinâmico médio de 80,5 e as SeNPs_QUI 96,7 nm, (Figura 15a e 15c). As SeCuNPs apresentaram distribuição de tamanho hidrodinâmico médio de 35,0 e 58,3 nm para as SeCuNPs_PVA e SeCuNPs_QUI, respectivamente (Figura 15b e 15d).

Figura 15 - Histogramas de DLS das nanopartículas: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

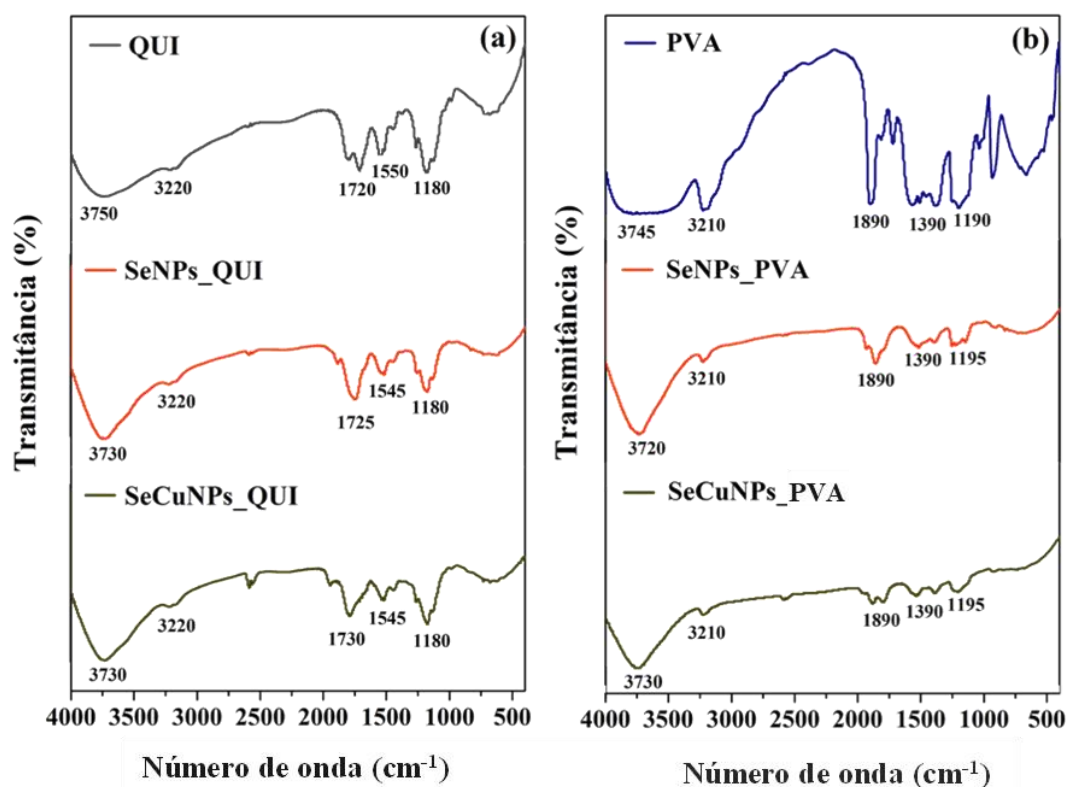
De maneira geral, é possível notar que a presença do cobre confere um tamanho hidrodinâmico menor às NPs, dado que corrobora com as análises de microscopia eletrônica de transmissão. Porém, vale salientar que, as medidas de DLS fornecem informações a respeito do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão, levando em consideração não apenas o tamanho das partículas, mas os íons e/ou moléculas presentes nas superfícies das mesmas e em seu entorno, logo, os tamanhos verificados a partir das técnicas de DLS e TEM serão diferentes, com tamanhos maiores para DLS (BARBOSA, 2018). Tal divergência foi observada por Khalid e colaboradores (2016), que ao sintetizar nanopartículas de selênio obtiveram, por DLS, uma média de tamanho de 80 nm, no entanto, os resultados de TEM

indicaram uma média de 50 nm para o tamanho das partículas. Analogamente, Zhang e colaboradores (2018) durante a caracterização de SeNPs verificaram uma média de tamanho de 36,8 nm e 20 nm, para as análises de DLS e TEM, respectivamente.

6.2.4 Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros obtidos a partir das análises de FTIR foram registrados para confirmar a presença dos estabilizantes, quitosana e PVA, na superfície das NPs, assim como averiguar as possíveis interações dos grupos funcionais presentes nos polímeros com esses materiais (Figura 16). Para melhor avaliar essas interações, foram feitos os espectros dos estabilizantes puros e com as NPs. Na Figura 16a encontram-se os espectros de FTIR da quitosana (QUI), SeNPs_QUI e SeCuNPs_QUI e na Figura 16b PVA, SeNPs_PVA e SeCuNPs_PVA.

Figura 16 - Espectros de FTIR: a) quitosana (QUI), SeNPs_QUI e SeCuNPs_QUI e b) PVA, SeNPs_PVA e SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

De acordo com a Figura 16a observa-se que os perfis vibracionais da quitosana e das nanopartículas estabilizadas nesse meio são semelhantes, apresentando bandas de estiramento

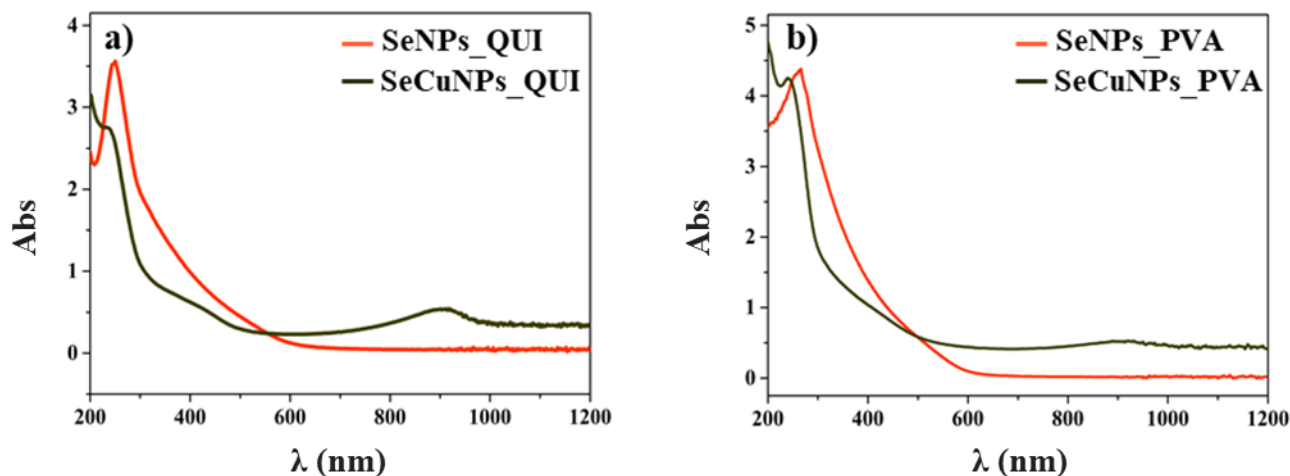
O-H em 3750 e 3730 cm^{-1} para as NPs; estiramento N-H de amina primária em 3220 cm^{-1} ; estiramento C=O em 1720 cm^{-1} ; deformação N-H em 1550 cm^{-1} ; e em 1180 cm^{-1} bandas de estiramento que podem ser atribuídas a C-N e C-O, sendo o sinal C-O mais intenso que o sinal do C-N e podendo se sobrepor a ele. O PVA e as NPs estabilizadas nesse meio, Figura 16b, exibiram bandas de estiramento O-H em 3745, 3730 e 3720 cm^{-1} , estiramento C-H em 3220 cm^{-1} , estiramento C-C em 1890 cm^{-1} , deformação C-H metilênico em 1390 cm^{-1} , conforme verificado na literatura (LOPES, FASCIO, 2004; PAVIA, et al., 2010; CHEN, et al., 2015; RAHIMAN, SETHUMANICKAM, 2017).

Os espectros obtidos revelaram as bandas características dos principais grupos funcionais presentes nos polímeros, indicando a presença destes na superfície das NPs. Comparando-se os espectros de quitosana e das SeNPs_QUI e SeCuNPs_QUI é possível notar deslocamentos nas bandas de O-H de 3750 para 3730 cm^{-1} . De maneira análoga, as SeNPs_PVA e as SeCuNPs_PVA exibiram deslocamentos nas bandas de O-H em comparação ao PVA, de 3750 para 3730 e 3720 cm^{-1} , respectivamente. Tais deslocamentos são relatados na literatura por diversos autores (KONG, et al., 2014; CHEN, et al., 2015; QIU, et al., 2018; YAN, et al., 2018; BOROUMAND, et al., 2019), e sugerem que há a interação entre os grupos O-H dos estabilizantes e as superfície das NPs, sendo a presença deste grupo nos estabilizantes importante para a estabilização e dispersão das NPs. Segundo Khan e colaboradores (2019), grupos hidroxila impedem a agregação de NPs por interações intermoleculares de hidrogênio.

6.2.5 Espectroscopia de absorção molecular no UV-vis

Ao avaliar os espectros de absorção, verificou-se que os perfis de absorção das NPs foram similares, exceto nas NPs bielementares onde há a presença do cobre pois, há duas bandas de absorção. O comprimento de onda de máxima absorção das SeNPs_QUI (Figura 17a, espectro laranja) é de 260 nm e o das SeNPs_PVA (Figura 17b, espectro laranja) é 250 nm, demonstrando um pequeno deslocamento em virtude do uso de diferentes estabilizantes. Em contrapartida, as NPs bielementares não apresentaram deslocamentos em função dos estabilizantes e os comprimentos de onda de máxima absorção foram observados em 240 e 900 nm para os dois tipos de nanopartículas (SeCuNPs_QUI e SeCuNPs_PVA) (Figura 17a e 17b, espectros verdes).

Figura 17 - Espectros de absorção das nanopartículas no UV-vis: a) NPs estabilizadas em quitosana e b) NPs estabilizadas em PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Os comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) obtidos para as SeNPs estão em consonância com dados da literatura, onde são reportados uma máxima absorção em comprimentos de onda de 212 nm (SHEN, et al., 2008), 260 nm (QIU, et al., 2018), 261 nm (KOKILA, ELAVARASAN, SUJATHA, 2017), 263 nm (KHIRALLA, EL-DEEB, 2015), 265 nm (NAIR, PRADEEP, 2002), 267 nm (CHEN, et al., 2015), 268 nm (CAVALU, et al., 2018), 290 nm (HEMALATHA, et al., 2014) e 295 nm (EL-DEEB, et al., 2018).

Segundo alguns autores (XIAO, et al., 2017; EL-DEEB, et al., 2018; QIU, et al., 2018) tais comprimentos de absorção correspondem à ressonância plamônica de superfície (SPR) destes materiais, que podem sofrer deslocamentos a depender de fatores como, tamanho, forma e composição da partícula, bem como o meio no qual se encontram. Quanto às NPs bielementares, estas apresentaram duas bandas de absorção, com comprimentos de onda iguais para ambos estabilizantes (SeCuNPS_QUI e SeCuNPS_PVA). A primeira banda em 240 nm se assemelha às bandas das SeNPs puras, com um ligeiro deslocamento de 10-20 nm (SeNPs_QUI = 260 e SeNPs_PVA = 250 nm). Em relação à segunda banda de absorção encontrada nas SeCuNPs_QUI e SeCuNPs_PVA, o perfil gráfico observado foi similar ao de materiais compostos por selênio e cobre relatados na literatura. Dorfs e colaboradores (2011) ao sintetizarem nanocristais de selênio e cobre, obtiveram materiais com absorção entre 800 a 1600 nm. Scotognella e colaboradores (2011) e Wolf e colaboradores (2016), sintetizaram nanopartículas contendo selênio e cobre e observaram $\lambda_{\text{máx}}$ de aproximadamente 1000 nm.

Esses dados corroboram com os obtidos neste trabalho ($\lambda_{\text{máx}} = 900 \text{ nm}$), e segundo tais autores, são os comprimentos de onda de SPR característicos desses materiais.

6.3 Aplicações biotecnológicas de SeNPs e SeCuNPs

6.3.1 Avaliação da capacidade antioxidante de SeNPs e SeCuNPs

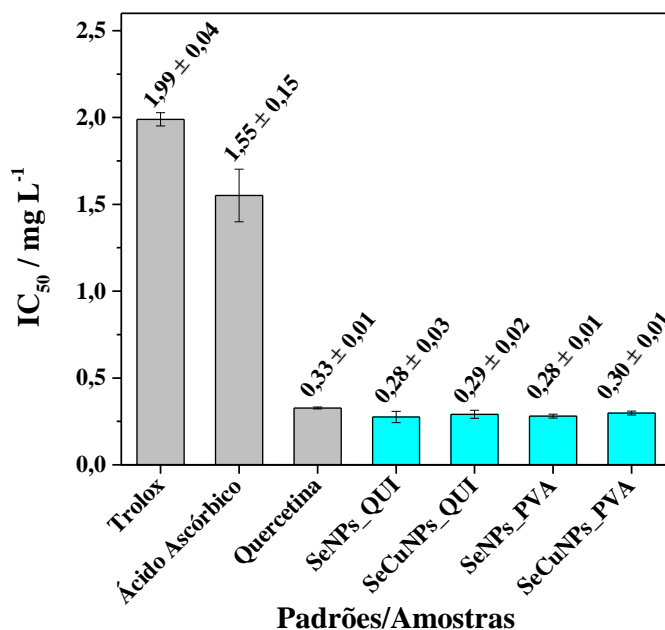
Existem diversos métodos para a determinação da capacidade antioxidante de amostras naturais e sintéticas, dentre os mais utilizados destacam-se os métodos colorimétricos que de forma geral, são simples, rápidos, de baixo custo, reprodutíveis e de fácil automatização. Os mecanismos podem ser baseados na reação de um radical, ou complexo oxidante com um composto antioxidante, capaz de doar átomos de hidrogênio ou elétrons (PISOSCHI, NEGULESCU, 2011).

6.3.1.1 Ensaio do sequestro do radical ABTS^{•+}

De acordo com os dados obtidos para o método do ABTS^{•+}, pôde-se observar que as SeNPs e as SeCuNPs em ambos estabilizantes apresentaram elevada capacidade antioxidante, quando comparadas aos padrões (Figura 18). As NPs foram de 81 a 86% mais eficientes em relação ao ácido ascórbico e trolox®. Em comparação à quercetina as NPs exibiram valores de IC₅₀ próximos, na faixa de $0,28 \pm 0,03$ a $0,30 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$, para as nanopartículas e $0,33 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para a quercetina. Vale salientar que, os estabilizantes (QUI e PVA), bem como o precursor das NPs (Na_2SeO_3), também foram avaliados, porém, apresentaram uma inibição menor que 10 % a uma concentração de 200 mg L^{-1} , comprovando sua eficiência apenas quando associados às NPs.

Por haverem apresentado resultados semelhantes, os valores de IC₅₀ das NPs e do padrão quercetina foram avaliados estatisticamente, aplicando análise de variância simples (*one way ANOVA*), para um intervalo de 95% de confiança. Assim, constatou-se que, não houve diferença significativa entre a média dos grupos de dados, $F_{\text{exp}} = 3,39 < F_{\text{crítico}} = 3,48$, ou seja, a capacidade antioxidante das nanopartículas é comparável à do padrão quercetina, para o método ABTS^{•+}.

Figura 18 - Capacidade antioxidante das NPs sintetizadas e dos padrões, pelo método ABTS^{•+}.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Os resultados indicam que um dos mecanismos de ação das SeNPs e das SeCuNPs como antioxidantes, envolve um processo de transferência de elétrons. Os dados obtidos corroboram com os reportados na literatura, evidenciando o potencial antioxidante de nanopartículas contendo selênio (CHEN, et al., 2015; XIAO, et al., 2017; QIU, et al., 2018). Dumore e Mukhopadhyay (2020) obtiveram valores de $IC_{50} \cong 2,7 \text{ mg L}^{-1}$, ao submeter nanopartículas de selênio aquosas ao método do $ABTS^{\bullet+}$. Ao sintetizar SeNPs conjugadas com exopolissacarídeo do fungo *Cordyceps sinensis* em diferentes proporções (1: 3, 1: 1 e 4: 3), Xiao e colaboradores (2017) observaram uma inibição de 88,89%, 85,53% e 69,88% a uma concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. No trabalho desenvolvido por Chen e colaboradores (2015), SeNPs estabilizadas com quitosana e carboximetilquitosana em uma concentração de 1 mmol L^{-1} inibiram 40% do radical $ABTS^{\bullet+}$, não apresentando diferença significativa entre os estabilizantes. Ademais, assim como no presente estudo o selenito de sódio (Na_2SeO_3), precursor da síntese das NPs, também apresentou uma inibição ínfima.

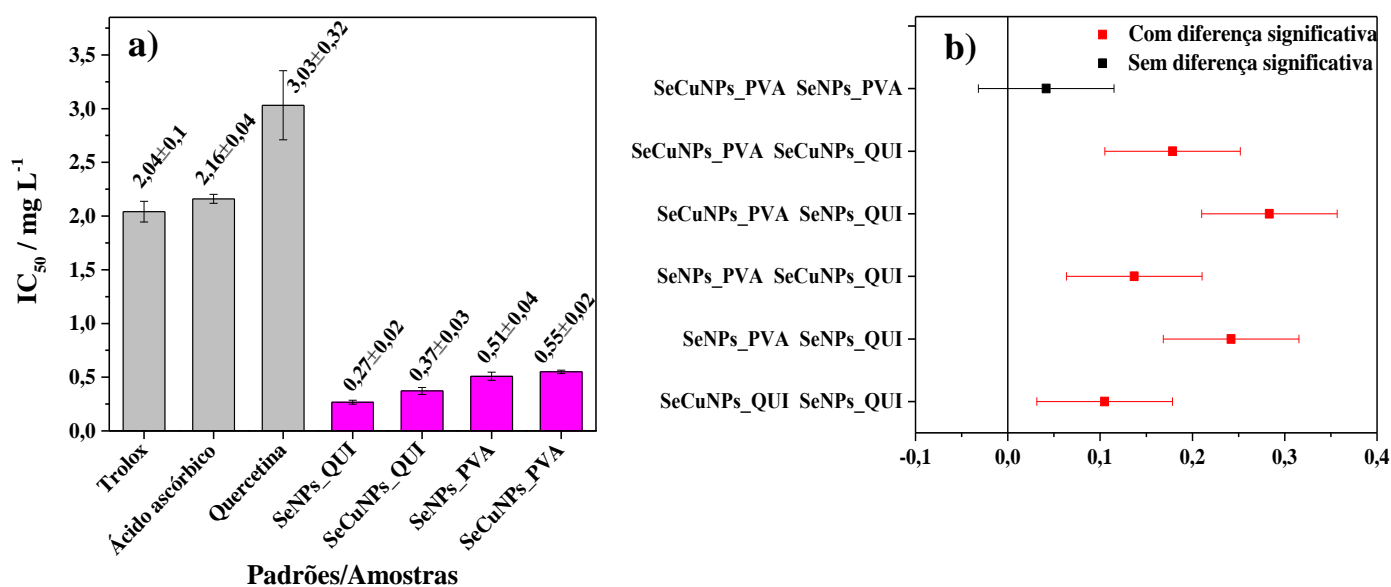
6.3.1.2 Ensaio do sequestro do radical DPPH[•]

Neste ensaio as nanopartículas apresentaram capacidade antioxidante superior aos padrões já estabelecidos (ácido ascórbico, trolox® e quercetina), conforme é possível observar na Figura 19. Os padrões apresentaram valores de IC_{50} entre 2,04 e 3,03 mg L^{-1} e as NPs entre 0,27 e 0,55 mg L^{-1} , com destaque para as NPs estabilizadas em quitosana ($IC_{50} = 0,27 \pm 0,02$ para SeNPs_QUI e $IC_{50} = 0,37 \pm 0,03$, para SeCuNPs_QUI), que foram de 82 a

91% mais eficientes que os padrões. Ao fazer uma comparação entre as NPs sintetizadas, quanto ao tipo de estabilizante empregado, foi possível constatar que aquelas estabilizadas em quitosana possuíram uma capacidade antioxidante maior que as NPs estabilizadas em PVA. Em relação à presença do cobre, as SeNPs exibiram potencial antioxidante maior que as SeCuNPs. Assim como para o método do ABTS^{•+}, os compostos estabilizantes (QUI e PVA) e o precursor das NPs (Na₂SeO₃), também foram avaliados, porém, apresentaram uma inibição menor que 10 % a 200 mg L⁻¹.

Os dados de IC₅₀ das NPs também foram avaliados estatisticamente, utilizando ANOVA *one way*, onde observou-se que, para um intervalo de 95% de confiança, existe diferença significativa entre as médias dos valores IC₅₀ nos diferentes grupos de NPs ($F_{\text{exp}} = 64,0 > F_{\text{crítico}} = 4,07$). Dessa maneira, rejeitou-se a hipótese nula e aceitou-se a hipótese alternativa de que pelo menos um par de médias difere significativamente. Ao aplicar o teste de Tukey, que compara as médias dos grupos e avalia quais desses diferem, verificou-se que apenas as SeCuNPs_PVA e SeNPs_PVA não diferiram, entre si (Figura 19b).

Figura 19 - Capacidade antioxidante das NPs pelo método DPPH[•]: a) IC₅₀ das nanopartículas e b) Comparação das médias usando teste de Tukey para um intervalo de confiança de 95%.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Os valores de IC₅₀ reduzidos para as nanopartículas no método do DPPH[•] corroboram com os resultados do método ABTS^{•+}, comprovando mais uma vez a alta capacidade antioxidante das SeNPs e das SeCuNPs. Além disso, tais valores são um indicativo do mecanismo de ação das nanopartículas, que envolve tanto a transferência de elétrons, quanto a

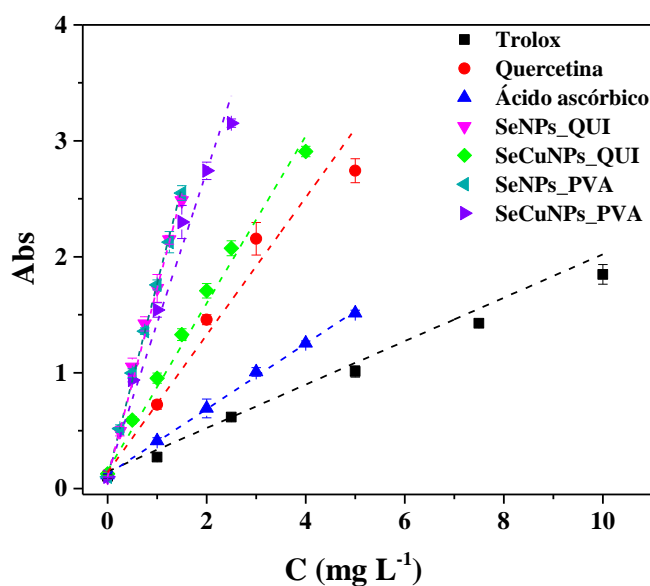
de átomos de hidrogênio. Diversos estudos têm relatado o potencial de inibição das SeNPs frente ao radical DPPH•. Kong e colaboradores (2014), obtiveram uma inibição de 85%, utilizando uma concentração de 4 mg mL⁻¹ de SeNPs estabilizadas com goma arábica. Qiu e colaboradores (2018), ao sintetizarem SeNPs estabilizadas com pectina, em uma proporção de 1:2 (Se:pectina), atingiram uma inibição de cerca de 92% com uma concentração de 400 µg mL⁻¹. Dumore e Mukhopadhyay (2020) obtiveram valores de IC₅₀ ≅ 54 mg L⁻¹, utilizando nanopartículas de selênio aquosas. Ao submeter SeNPs estabilizadas em quitosana e carboximetilquitosana ao método do DPPH•, Chen e colaboradores (2015) constataram uma inibição de mais de 80% em uma concentração de 0,6 mmol L⁻¹.

Em contrapartida, avaliando o trabalho desenvolvido por Boroumand e colaboradores (2019), que realizaram estudos com SeNPs com os mesmos estabilizantes utilizados neste trabalho (quitosana e PVA), verifica-se uma divergência nos resultados. Os valores de IC₅₀ foram menores para as SeNPs estabilizadas em PVA, (SeNPs_PVA, IC₅₀ = 26,56 mg L⁻¹ e SeNPs_QUI IC₅₀ = 530 mg L⁻¹), enquanto no presente trabalho foi observado o inverso. Tal discrepância, ratifica a importância de estudos como este, para melhor elucidar o comportamento das NPs em diferentes agentes estabilizantes.

6.3.1.3 Ensaio do potencial de redução do ferro (FRAP)

Para o ensaio do potencial de redução de Fe³⁺, a capacidade antioxidante foi avaliada com base nas curvas analíticas, utilizando como parâmetro a sensibilidade obtida a partir dos valores de coeficiente angular das respectivas curvas. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 20.

Figura 20 - Curvas analíticas dos padrões e das nanopartículas sintetizadas para determinação da capacidade de redução de íons Fe³⁺.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

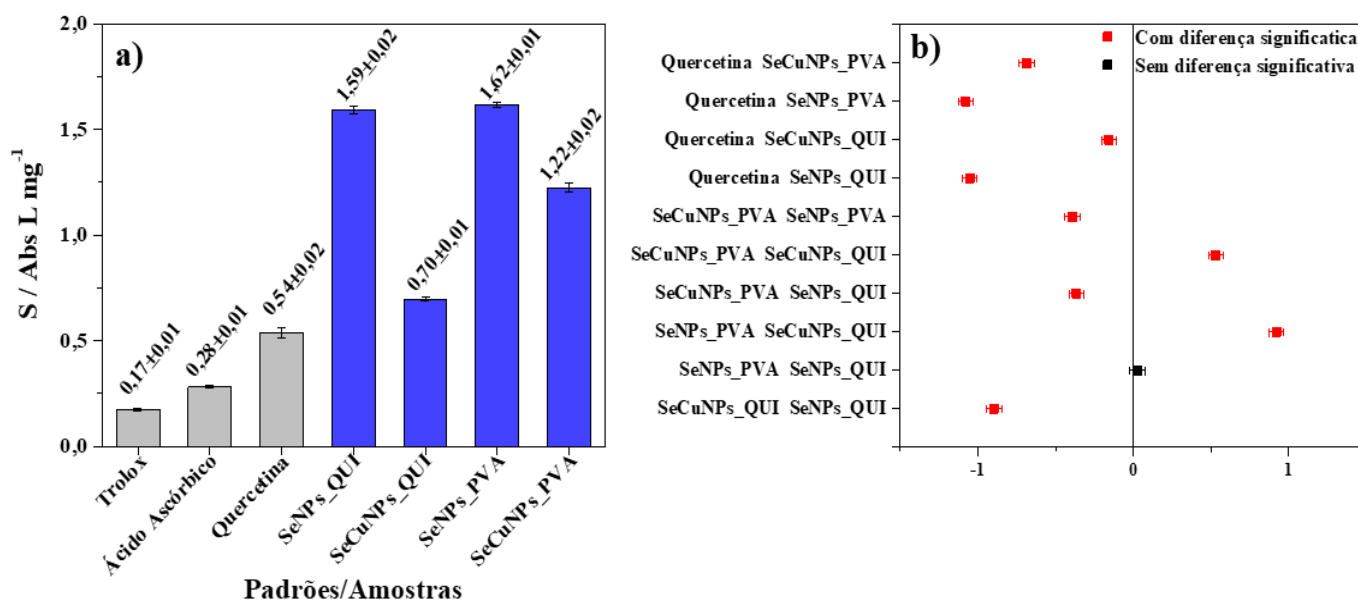
A partir dos dados expostos na Figura 20 foram obtidas as seguintes equações:

$$\begin{aligned}
 \text{Abs} &= 0,17(\pm 0,01)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,13(\pm 0,003), r = 0,9922 & | \text{Trolox}^{\text{®}} \\
 \text{Abs} &= 0,54(\pm 0,02)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,25(\pm 0,06), r = 0,9998 & | \text{Quercetina} \\
 \text{Abs} &= 0,28(\pm 0,01)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,13(\pm 0,01), r = 0,9920 & | \text{Ácido ascórbico} \\
 \text{Abs} &= 1,59(\pm 0,02)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,15(\pm 0,04), r = 0,9994 & | \text{SeNPs_QUI} \\
 \text{Abs} &= 0,70(\pm 0,01)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,24(\pm 0,01), r = 0,9968 & | \text{SeCuNPs_QUI} \\
 \text{Abs} &= 1,62(\pm 0,01)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,13(\pm 0,02), r = 0,9997 & | \text{SeNPs_PVA} \\
 \text{Abs} &= 1,22(\pm 0,02)C_{\text{Fe}(\text{red})} + 0,26(\pm 0,01), r = 0,9920 & | \text{SeCuNPs_PVA} \quad (5)
 \end{aligned}$$

Baseado nos valores de sensibilidade, que podem ser melhor observados na Figura 21a, as NPs possuíram uma elevada capacidade redutora de Fe^{3+} em comparação aos padrões. Dentre as nanopartículas avaliadas, as SeNPs apresentaram uma maior sensibilidade que os padrões, cerca de 3 a 9,5 vezes maior. Em se tratando das SeCuNPs, destacam-se as SeCuNPs_PVA as quais foram de 56 a 86% mais sensíveis que os padrões estabelecidos. Comparando as NPs de acordo com os estabilizantes, as NPs estabilizadas em PVA exibiram maior sensibilidade. Os compostos estabilizantes (QUI e PVA) assim como o precursor das NPs (selenito de sódio), também foram avaliados, de forma individual, entretanto, não apresentaram alterações com relação ao sinal de referência 200 mg L^{-1} .

Devido à proximidade entre os valores de sensibilidade das NPs e do padrão quercetina, foi feita uma avaliação estatística, utilizando ANOVA *one way*, para um intervalo de 95% de confiança, a partir da qual foi observada uma diferença significativa entre as médias dos valores ($F_{exp} = 2469,28 > F_{critico} = 3,48$). Ao aplicar o teste de Tukey (Figura 21b), para verificar quais dessas médias diferem, verificou-se que dentre os grupos das amostras e dos padrões, apenas as SeNPs_QUI e as SeNPs_PVA não diferiram significativamente, isto é, ambas possuíram uma capacidade redutora equivalente.

Figura 21 - Capacidade antioxidante das NPs sintetizadas, pelo método FRAP: a) Sensibilidade das nanopartículas e b) Comparação das médias por meio do teste de Tukey para um intervalo de confiança de 95%.



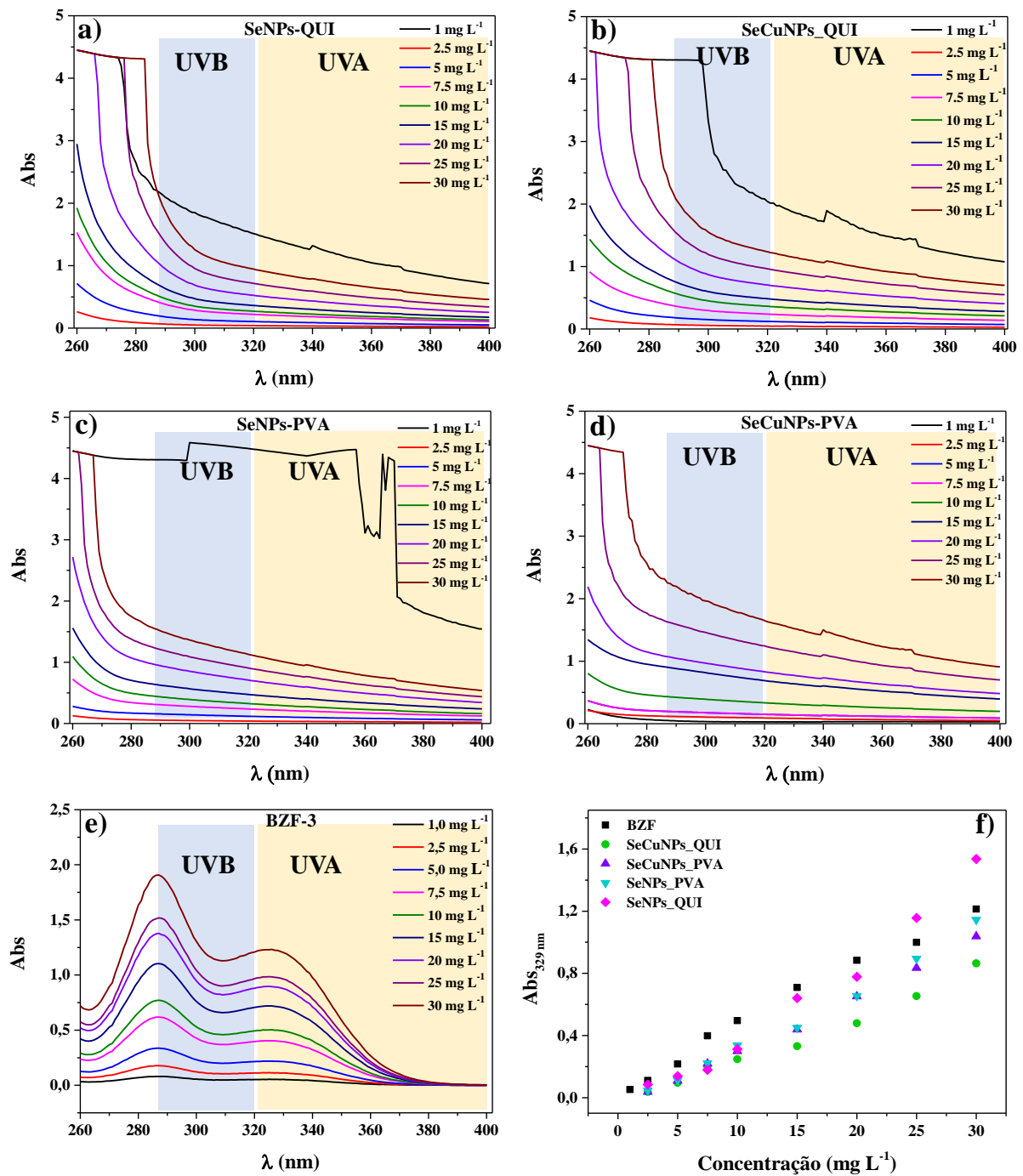
Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Embora o método FRAP não seja frequentemente utilizado para a avaliação do potencial antioxidante de SeNPs, sendo majoritário o uso dos métodos do ABTS^{•+} e DPPH[•], alguns autores comprovaram a eficiência destas NPs frente a este método (VYAS, RANA, 2017; QIU, et al. 2018; VENNILA, et al., 2018; MELLINAS, JIMÉNEZ, GARRIGÓS, 2019). Os resultados, expostos no presente trabalho, além de corroborarem com os dados da literatura com relação à SeNPs, que evidenciaram a capacidade redutora das NPs contendo selênio, contribuem para a disseminação de informações acerca dos mecanismos de ação deste tipo de nanopartícula.

6.3.2 Fator de Proteção Solar UVB *in vitro*

Inicialmente foram obtidos os espectros de absorção das nanopartículas e do composto BZF-3 nas diferentes concentrações (Figura 22a-e), por meio dos quais foi possível observar que as NPs apresentaram absorção nas regiões UVA e UVB. A partir dessas curvas de varredura, foi feita a linearização dos resultados em um comprimento de onda fixo de 329 nm (Figura 22f), onde as curvas analíticas demonstram que todas as NPs apresentaram faixa linear entre 1 e 30 mg L⁻¹, assim como o padrão.

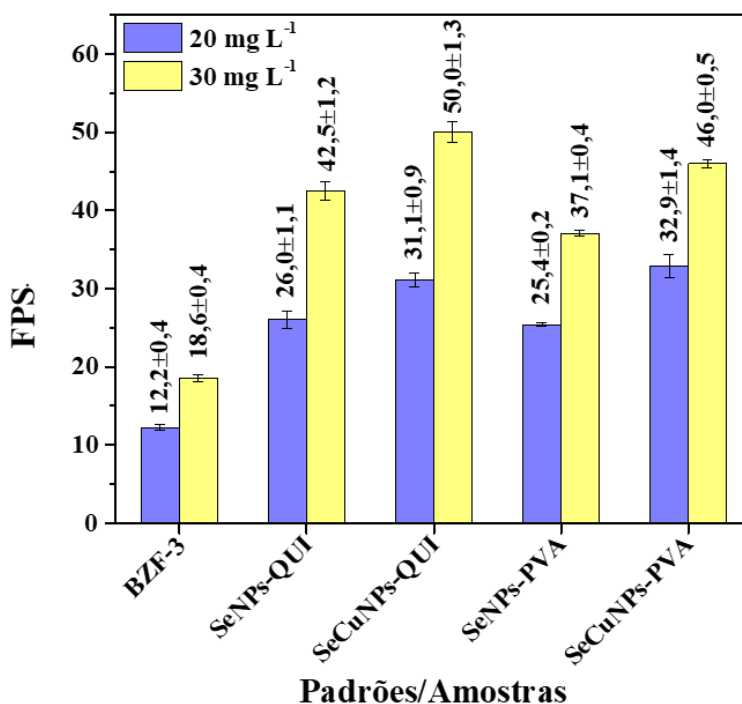
Figura 22 - Espectros de absorção das nanopartículas nas regiões UVA e UVB ($\lambda = 260-400$ nm): a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA, d) SeCuNPs_PVA, e) BZF-3 e f) Curvas analíticas das nanopartículas e do padrão.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Considerando as curvas analíticas, optou-se por realizar os cálculos do FPS com as concentrações de 20 e 30 mg L⁻¹, que se encontram dentro faixa ótima de análise, mantendo a linearidade. Os valores foram calculados utilizando o método *in vitro* estabelecido por Mansur e colaboradores (1986), descrito na equação 3 e os resultados encontram-se na Figura 23.

Figura 23 - Valores de FPS para as nanopartículas e o padrão BZF-3 nas concentrações de 20 e 30 mg L⁻¹.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

De acordo com os resultados, verificou-se que as nanopartículas exibiram valores de FPS expressivos quando comparadas ao padrão. Estes valores podem ser melhor avaliados na tabela 4. Onde é possível observar ainda que em ambas as concentrações (20 mg L⁻¹ e 30 mg L⁻¹) as NPs apresentaram aproximadamente o dobro dos valores de FPS do padrão estabelecido.

Tabela 4 - Valores de FPS para o padrão e para as nanopartículas sintetizadas nas concentrações de 20 e 30 mg L⁻¹.

Padrão/amostras	FPS para 20 e 30 mg L ⁻¹
BZF-3	12,2 ± 0,4 / 18,6 ± 0,4
SeNPS_QUI	26,0 ± 1,1 / 42,5 ± 1,2
SeCuNPS_QUI	31,1 ± 0,9 / 50,0 ± 1,3
SeNPS_PVA	25,4 ± 0,2 / 37,1 ± 0,4
SeCuNPS_PVA	32,9 ± 1,4 / 46,0 ± 0,5

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Em virtude da similaridade entre os valores de FPS das nanopartículas, avaliou-se estatisticamente os dados, utilizando ANOVA *one way*, para um intervalo de 95% de confiança. Ao avaliar os valores de FPS para a concentração de 20 mg L⁻¹, verificou-se que a média das NPs apresentaram diferença significativa entre si ($F_{\text{exp}} = 39,9 > F_{\text{critico}} = 4,07$). O mesmo foi observado para o FPS na concentração de 30 mg L⁻¹ ($F_{\text{exp}} = 95,99 > F_{\text{critico}} = 4,07$).

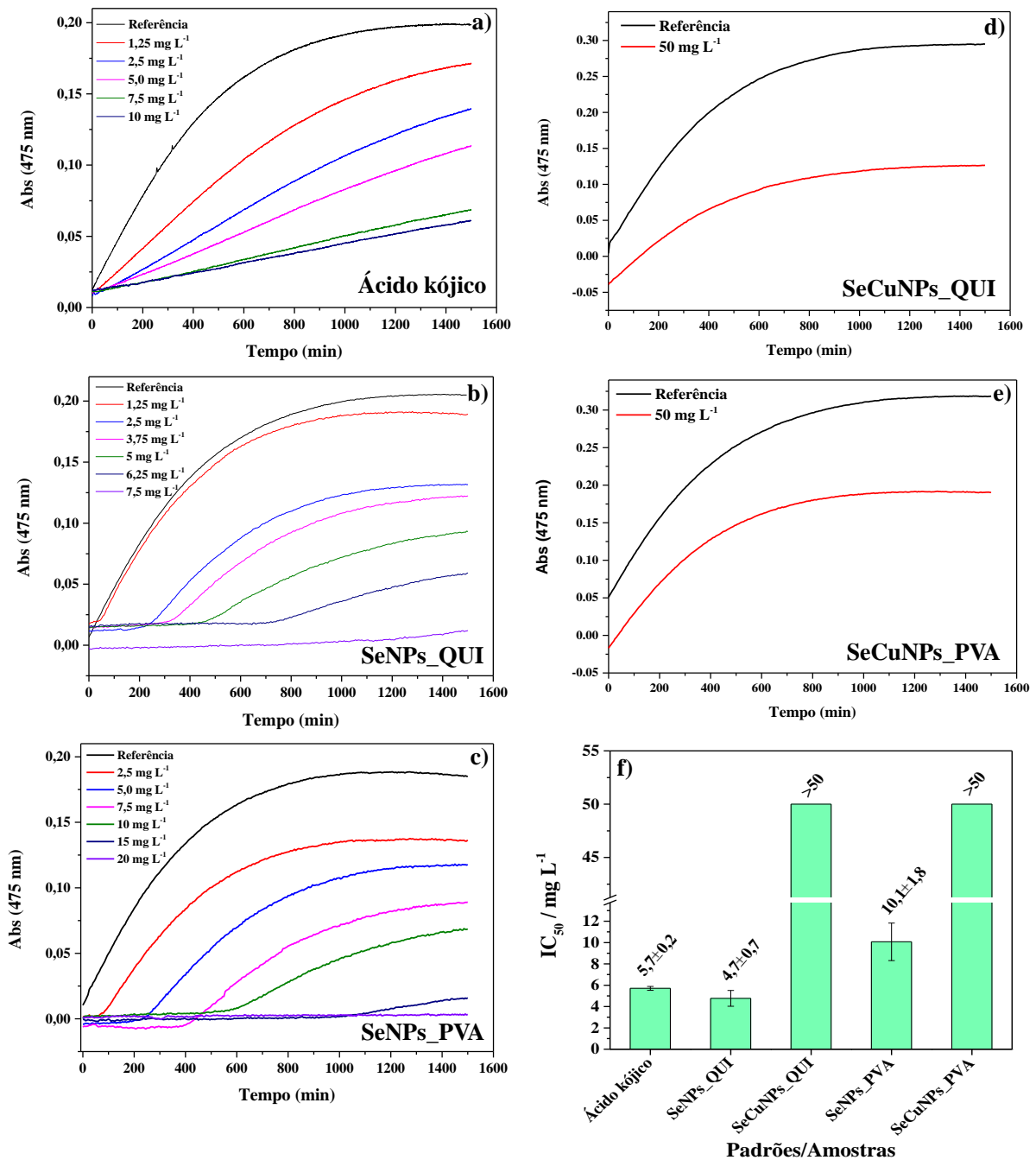
Comparando os resultados obtidos com os valores preconizados pelos órgãos reguladores, as nanopartículas exibiram valores superiores, constatando assim sua elevada atividade fotoprotetora. De acordo com as normas da ANVISA, que regulamenta acerca dos fotoprotetores em cosméticos, os protetores solares devem possuir um fator de proteção solar mínimo de 6 (ANVISA, 2012). Em contrapartida, a FDA, estabelece um valor mínimo de 15, para fotoprotetores em loções cosméticas (FDA, 2017). Com relação ao composto padrão, empregado em fórmulas comerciais, este só se encontrou de acordo com as duas regulamentações na concentração de 30 mg L⁻¹.

Realizando uma comparação com dados literatura, Kaur e Rath (2019) que prepararam uma formulação tópica de proteção UV para cuidados com a pele, contendo SeNPs, probióticos e prebióticos, a formulação apresentou um fator de proteção solar (FPS) de 29,77. Tais valores são próximos dos valores encontrados no presente trabalho, para o mesmo tipo de nanopartícula. É importante ressaltar que, estudos envolvendo nanopartículas contendo selênio com atividade fotoprotetora se configuram como um campo pouquíssimo explorado, sendo a grande maioria dos estudos voltados para nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco, já utilizados como filtros inorgânicos (YEAGER, LIM, 2019; BAILLO, LIMA, 2012).

6.3.3 Inibição da tirosinase

As curvas cinéticas da inibição da tirosinase para as NPs e para o inibidor padrão ácido kójico (Figura 24), demonstraram que além do composto padrão, apenas as SeNPs apresentaram boa inibição. As SeCuNPs, mesmo em concentrações elevadas (50 mg L⁻¹), exibiram baixa inibição e, por essa razão, a avaliação foi realizada apenas para as SeNPs_QUI, SeNPs_PVA e para o ácido kójico, com valores de $IC_{50} = 5,7 \pm 0,2$; $4,7 \pm 0,7$ e $10,1 \pm 1,8$, respectivamente.

Figura 24 - Curva cinética de inibição da tirosinase do padrão e das nanopartículas: a) Ácido kójico, b) SeNPs_QUI, c) SeCuNPs_QUI, d) SeNPs_PVA, e) SeCuNPs_PVA e f) Valores de IC_{50} para as nanopartículas e compostos avaliados.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Comparando os valores de IC_{50} verificou-se que apenas as SeNPs_QUI apresentaram valores similares ao padrão e ao aplicar o teste *t student*, para 95% de confiança, esses não

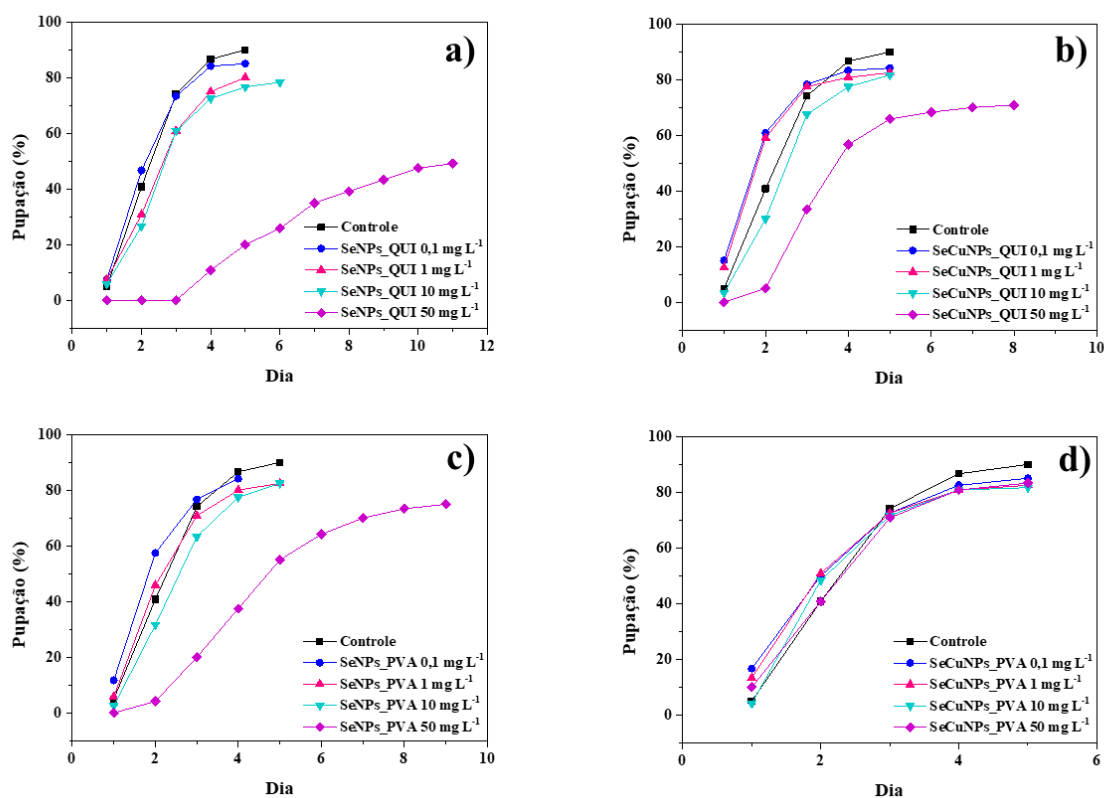
apresentaram diferença significativa comprovando a equivalência entre ambos ($T_{\text{exp}} = 2,22 > T_{\text{crítico}} = 4,03$). Outros tipos de NPs têm sido estudadas sob esse aspecto. Gubitosa e colaboradores (2020) sintetizaram nanopartículas de ouro recobertas com quitosana e ácido elágico, que em uma concentração de $2,5 \cdot 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ foram capazes de inibir 45% de tirosinase. Ekennia e colaboradores (2021), obtiveram valores de $IC_{50} = 66,28 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, para nanopartículas biogênicas de óxido de zinco.

Vale salientar que trabalhos como esse ainda não foram realizados para NPs contendo selênio e, em virtude dos resultados promissores para as SeNPs_QUI, se verifica uma demanda pelo desenvolvimento de estudos dessa natureza.

6.3.4 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Como pode ser observado na Figura 25a, b, c, e d, de acordo com o controle, a pupação das larvas ocorreu em aproximadamente 5 dias. Em comparação aos animais expostos às nanopartículas nas concentrações de até 10 mg L^{-1} . Os resultados foram equivalentes mantendo o mesmo intervalo de tempo, para a concentração de 50 mg L^{-1} , houve um atraso larval de até 11 dias, exceto para as SeCuNPs_PVA.

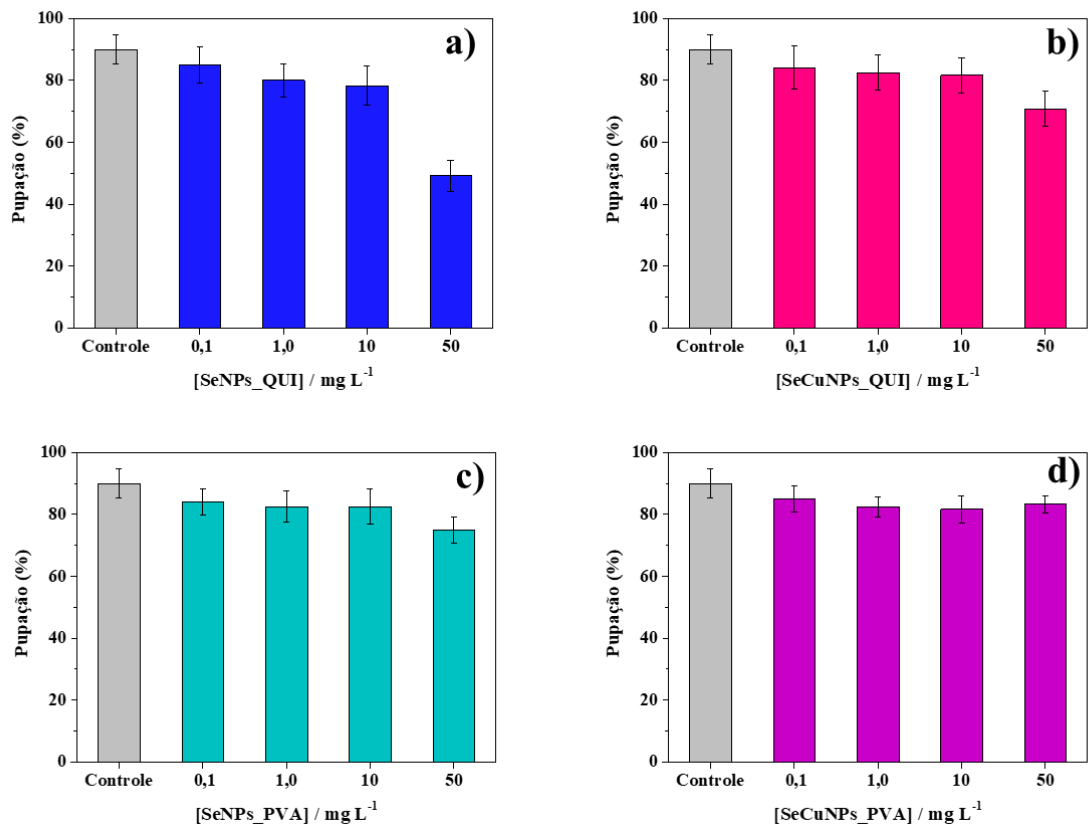
Figura 25 - Gráficos de pupação larval do inseto *D. melanogaster* ao longo dos dias para as NPs e estabilizantes: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA ed) SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

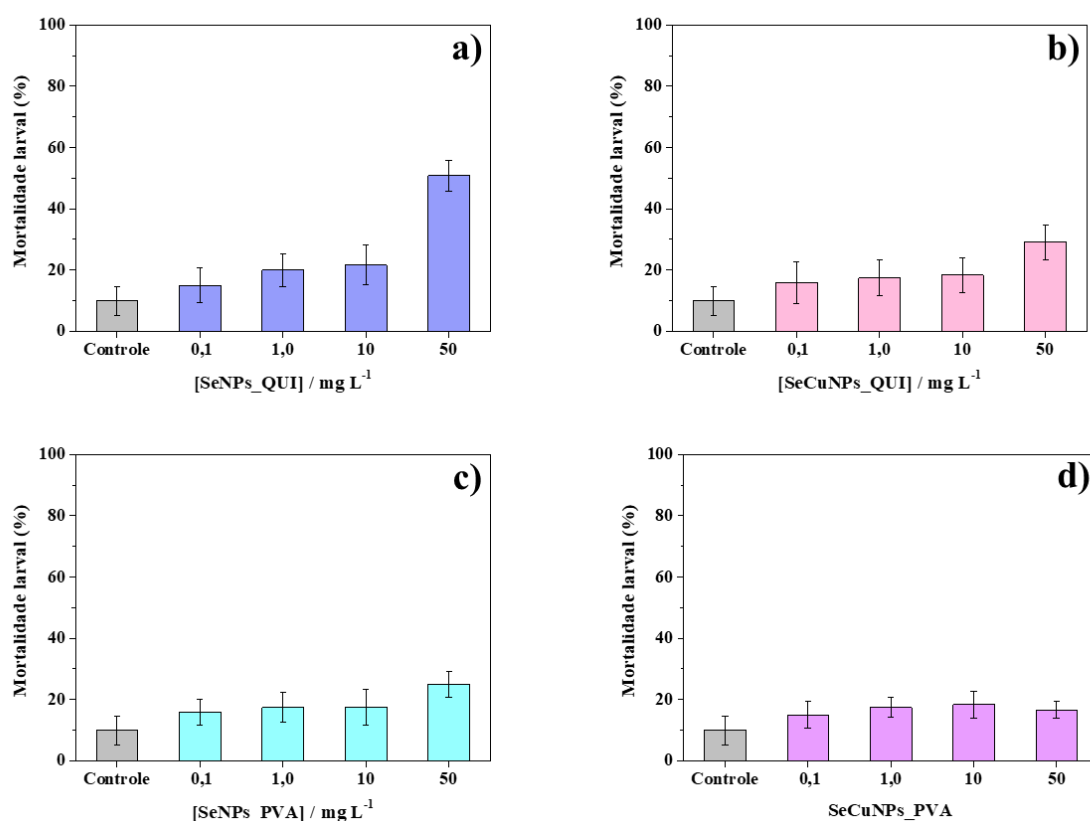
Comparando a porcentagem de pupação das NPs com o controle verificou-se uma tendência, onde para a maior concentração (50 mg L^{-1}) houve uma diminuição do número de pupas. Com uma taxa de pupação de $90,0 \pm 4,71\%$, para o controle e de $49,2 \pm 5,0\%$; $70,8 \pm 5,7\%$; $75,0 \pm 4,30 \%$ e $83,3 \pm 2,7\%$, para as SeNPs_QUI, SeCuNPs_QUI, SeNPs_PVA e SeCuNPs_PVA, respectivamente (Figura 26a, b, c e d). Conseqüentemente, a diminuição da porcentagem de pupas ocorre em virtude da mortalidade dos animais ainda na fase pupal, que para a maior concentração de NPs variou entre $16,7 \pm 2,7\%$ e $50,8 \pm 5,0\%$ (Figura 27a, b, c e d).

Figura 26 - Gráficos de porcentagem de pupação em função da concentração: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

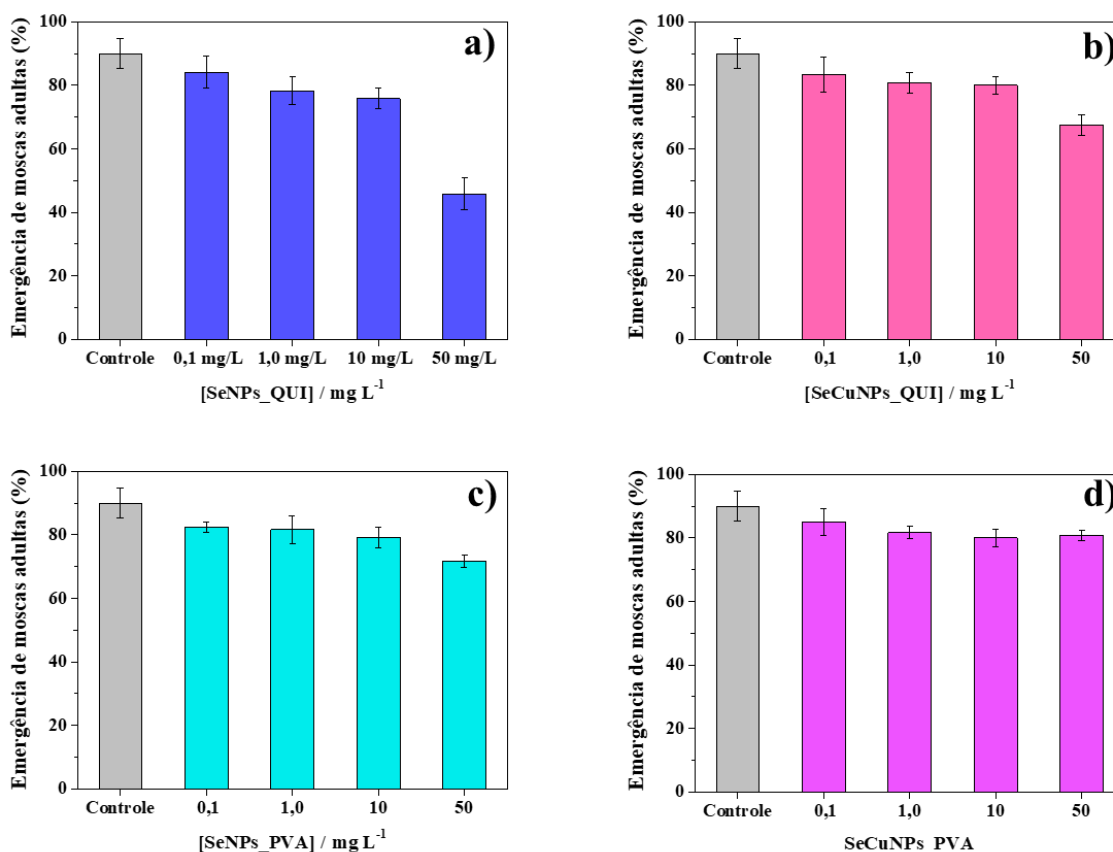
Figura 27 - Gráficos de percentual da mortalidade larval em função da concentração: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA e d) SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

Com relação as taxas de emergência das moscas adultas (Figura 28a, b, c e d), observou-se um efeito deletério também nas concentrações de 50 mg L⁻¹. Esse efeito foi verificado desde a fase de pupação, de modo que, houveram poucas variações entre esses resultados, com taxas de emergência das moscas adultas de $45,8 \pm 5,0\%$; $67,5 \pm 3,25\%$; $71,7 \pm 1,92\%$ e $80,8 \pm 1,7\%$, para as e SeNPs_QUI, SeCuNPs_QUI, SeNPs_PVA e SeCuNPs_PVA, respectivamente. Assim, constatou-se que, o efeito deletério das nanopartículas ocorreu na fase de pupação, onde os animais passam da fase larval (considerada a mais frágil) para a fase de pupa, sendo essa a mais sensível a altas concentrações das nanopartículas.

Figura 28 - Gráficos do percentual de emergência de moscas adultas: a) SeNPs_QUI, b) SeCuNPs_QUI, c) SeNPs_PVA ed) SeCuNPs_PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

As variações entre os resultados de toxicidade podem ser melhor analisadas na tabela 5, onde estão dispostos os resultados para todas as nanopartículas nas diferentes concentrações avaliadas, assim como a diferença percentual entre o tratamento com as NPs e o controle. Essa comparação da diferença percentual entre o tratamento com as NPs e o grupo controle, comprova mais uma vez que a toxicidade ocorre apenas para a maior concentração avaliada.

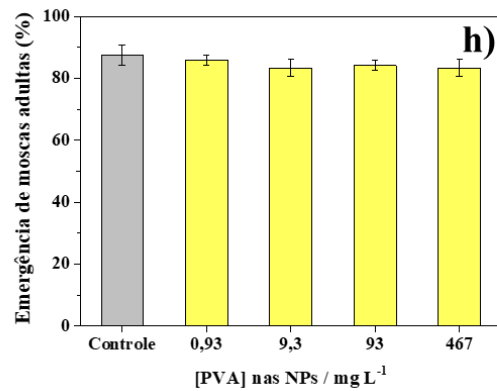
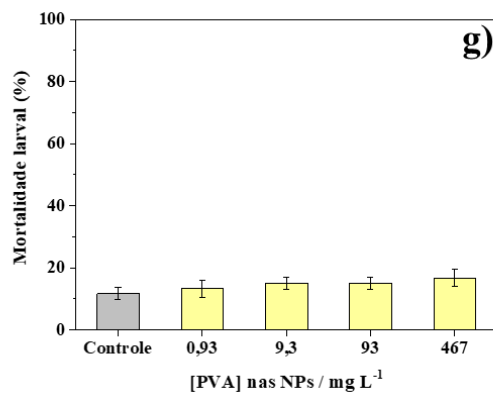
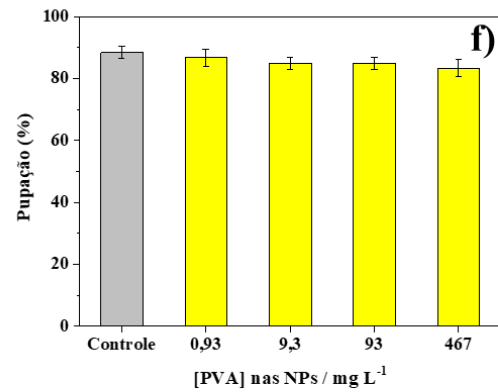
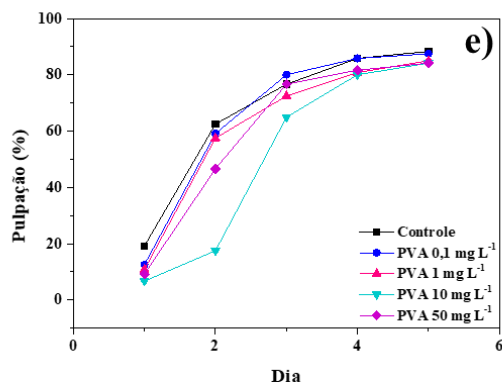
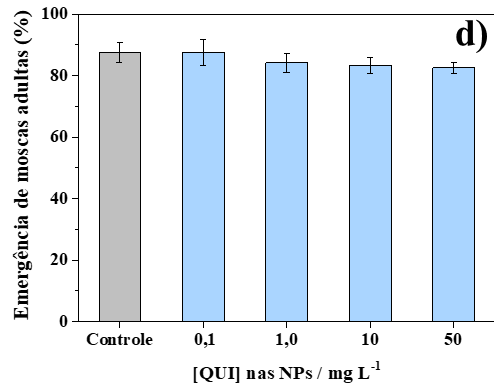
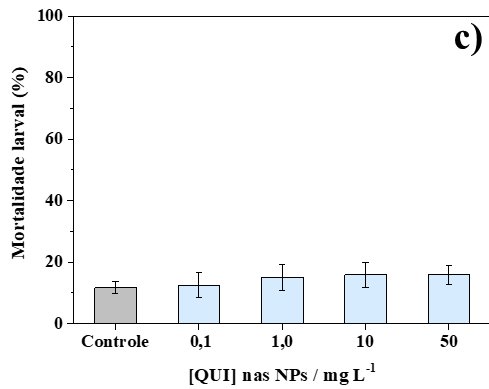
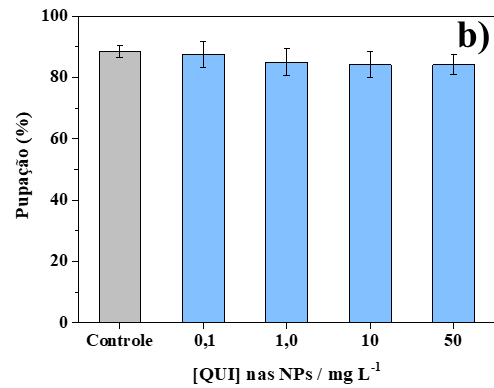
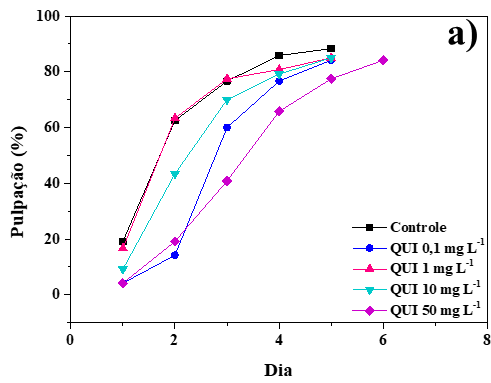
Tabela 5 - Comparação entre os resultados da análise de toxicidade para as nanopartículas avaliadas em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 50 mg L⁻¹).

Concentrações (mg L ⁻¹)	Parâmetros	Controle	SeNPs_QUI	SeCuNPs_QUI	SeNPs_PVA	SeCuNPs_PVA	Diferença do Controle (%)
0,1	% Pupação	90 ± 4,7	85 ± 5,8	84,2 ± 6,9	84,2 ± 4,2	85 ± 4,3	5-5,8
	% larvas mortas	10 ± 4,7	15 ± 5,8	15,8 ± 6,9	15,8 ± 4,2	15 ± 4,3	5-5,8
	% emergência de moscas adultas	90 ± 4,7	84,2 ± 5	83,3 ± 5,4	82,5 ± 1,7	85 ± 4,3	5-7,5
1,0	% Pupação	90 ± 4,7	80 ± 5,4	82,5 ± 5,7	82,5 ± 5	82,5 ± 3,2	7,5-10
	% larvas mortas	10 ± 4,7	20 ± 5,4	17,5 ± 5,7	17,5 ± 5	17,5 ± 3,2	7,5-10
	% emergência de moscas adultas	90 ± 4,7	78,3 ± 4,3	80,8 ± 3,2	81,7 ± 4,3	81,7 ± 1,9	8,3-11
10	% Pupação	90 ± 4,7	78,3 ± 6,4	81,7 ± 5,8	82,5 ± 5,7	81,7 ± 4,3	7,5-11,7
	% larvas mortas	10 ± 4,7	21,7 ± 6,4	18,3 ± 5,8	17,5 ± 5,7	18,3 ± 4,3	7,5-11,7
	% emergência de moscas adultas	90 ± 4,7	75,8 ± 3,2	80 ± 2,8	79,2 ± 3,2	80 ± 2,7	10-14,2
50	% Pupação	90 ± 4,7	49,2 ± 5,0	70,8 ± 5,7	75 ± 4,3	83,3 ± 2,7	6,7-40,8
	% larvas mortas	10 ± 4,7	50,8 ± 5,0	29,2 ± 5,7	25 ± 4,3	16,7 ± 2,7	6,7-40,8
	% emergência de moscas adultas	90 ± 4,7	45,8 ± 5,0	67,5 ± 3,2	71,7 ± 1,9	80,8 ± 1,7	9,2-44,2

Semelhantemente Yazhiniprabha e Vaseeharan (2019) realizaram estudos para avaliar a toxicidade *in vivo*, de SeNPs sintetizadas com extrato aquoso de frutos silvestres de *Murraya koenigii*. Náuplios de *Artemia* foram utilizados como modelo, e após um tratamento de 48 h a taxa de mortalidade observada para a maior dose ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi de 3,37 %.

Em se tratando dos agentes estabilizantes quitosana e PVA, verificou-se que a porcentagem de pupação, as taxas de mortalidade larval, bem como as taxas de emergência de moscas adultas, apresentaram valores muito próximos ao controle (Figura 29a-h), demonstrando uma baixa toxicidade destes compostos, assim como reportado na literatura (BOROUMAND, et al., 2019). As alterações discretas nos dias de pupação para a quitosana na concentração mais alta não compromete a potencialidade de aplicações futuras, pois mesmo havendo um atraso larval, as taxas de mortalidade larval e de emergência dos animais adultos não foi alterada.

Figura 29 - Gráficos de porcentagem de pupação em função da concentração: a) QUI e e) PVA; gráficos de porcentagem de pupação em função da concentração: b) QUI e f) PVA; gráficos de percentual da mortalidade larval em função da concentração: c) QUI e g) PVA; e gráficos do percentual de emergência de moscas adultas: d) QUI e h) PVA.



Fonte: elaborada pela autora, 2020.

A fim de comprovar que não houveram alterações significativas, aplicou-se ANOVA, para um intervalo de 95% de confiança, entre as médias do controle e dos estabilizantes (QUI e PVA) nas maiores concentrações, porém observou-se que não houve diferença significativa entre os resultados (% pupação $F_{\text{exp}} = 4,17 < F_{\text{crít}} = 4,26$; % Emergência de moscas adultas $F_{\text{exp}} = 2,86 < F_{\text{crít}} = 4,26$).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente trabalho viabilizou sintetizar e caracterizar SeNPs e SeCuNPs estabilizadas em quitosana e PVA com forma esférica.

A presença do cobre nas SeCuNPs promoveu uma redução no tamanho, quando comparadas às SeNPs, e verificou-se que os diferentes estabilizantes não tiveram influência sobre o tamanho médio dessas NPs, que foram de 35 nm para SeCuNPs_PVA e 36 nm para as SeCuNPs_QUI, enquanto as SeNPs sofreram influência, apresentando tamanhos de 78 e 94 nm, para as SeNPs_PVA e as SeNPs_QUI, respectivamente. Quanto aos raios hidrodinâmicos das NPs, foi observado o mesmo comportamento de diminuição de tamanho por parte das SeCuNPs.

A presença dos agentes estabilizantes, quitosana e PVA, na superfície das nanopartículas, bem como a possível interação dos grupos OH com as NPs foi confirmada com o auxílio da técnica de FTIR. As SeCuNPs em ambos os estabilizantes apresentaram duas bandas de absorção em 240 e 900 nm, enquanto as SeNPs puras exibiram uma única banda em 250 e 260 nm para PVA e quitosana, respectivamente.

Em se tratando da capacidade antioxidante, as nanopartículas apresentaram um elevado potencial, com resultados equivalentes e, em sua maioria, superiores aos padrões estabelecidos (trolox®, ácido ascórbico e quercetina). A resposta positiva aos três métodos avaliados (ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP) indica que os possíveis mecanismos de ação das NPs ocorrem via transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio. Dentre as nanopartículas avaliadas, destacaram-se as SeNPs_QUI e as SeNPs_PVA, que de forma geral tiveram os melhores resultados.

As nanopartículas sintetizadas apresentaram índices de FPS superiores ao padrão e dentro das normas estabelecidas pelos órgãos reguladores, ANVISA e FDA.

Apenas as SeNPs foram capazes de inibir a tirosinase em baixas concentrações, e apenas as SeNPs_QUI geraram valores de IC₅₀ comparáveis ao padrão ácido kójico.

No que se refere aos ensaios com modelo *in vivo*, as nanopartículas demonstraram toxicidade apenas na concentração mais extrema, 50 mg L⁻¹, exceto as SeCuNPs_PVA, que não apresentaram toxicidade.

Os resultados obtidos ao longo do presente trabalho evidenciaram aplicações inéditas de SeNPs e SeCuNPs conferindo a potencialidade biotecnológica desses materiais, de forma segura para ampla faixa de concentração.

8 PERSPECTIVAS

Avaliar a fotoestabilidade das nanopartículas;

Determinar o FPS na região UVA.

REFERÊNCIAS

- AL-HADDAD, J. et al. Green synthesis of bimetallic copper–silver nanoparticles and their application in catalytic and antibacterial activities. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 22, p. 269-277, 2020.
- ANDRADE, M. J. et al. Unravelling the insulin-like growth factor I-mediated photoprotection of the skin. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 52, p.45-55, 2020.
- ANITHA, J. et al. Biosynthesis of Ag Nanoparticles Using *Amaranthus tristis* Extract for the Fabrication of Nanoparticle Embedded PVA Membrane Current. *Nanoscience*, v. 8, p. 703-708, 2012.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Disponível em <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.html > acesso em 27 de novembro de 2020.
- ARAÚJO, C. R. M.; et al. Síntese e determinação *in vitro* do FPS-UVB de oximas derivadas do lapachol. *Ver. Virtual de Química*. v.6 (6). P. 1702-1712, 2014.
- ASERE, T. G. Exploring potential environmental applications of selenium nanoparticles. Dissertação de mestrado. Ghent University. Ghent. 2013.
- BAI, Y. et al. Modification and modulation of saccharides on elemental selenium nanoparticles in liquid phase. *Mater Lett*, v. 62(15), p. 2311-2314, 2008.
- BAI, K. Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres. *Int. J. Nanomedicine*, v. 12, p. 4527-4539, 2017.
- BAILLO, V. P., LIMA, A. C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. *Ver. Bras. Farm.*, v. 93(3), p. 271-278, 2012.
- BARBOSA, V. T. Síntese biogênica de nanopartículas de prata usando própolis vermelha de Alagoas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2018.
- BARTŮŇEK, V. et al. Preparation of amorphous antimicrobial selenium nanoparticles stabilized by odor suppressing surfactant polysorbate 20. *Materials Letters*, v. 152, p. 207-209, 2015.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337-351, 2016.
- BOROUMAND, S. et al. Selenium nanoparticles: synthesis, characterization and study of their cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity. *Mater. Res. Express*, v. 6, p. 1-9, 2019.
- BOUYANFIF, A. et al. Review of FTIR microspectroscopy applications to investigate biochemical changes in *C. elegans*. *Vibrational Spectroscopy*, v. 96, p. 74-82, 2018.

CAO, H.; XIAO, J.; LIU, H. Enhanced oxidase-like activity of selenium nanoparticles stabilized by chitosan and application in a facile colorimetric assay for mercury (II). *Biochemical Engineering Journal*, v. 152, p. 1-10, 2019.

CARDOSO, E. T. C. Inibição da atividade da tirosinase por análogos do ácido kójico. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará. Belém. 2014.

CASTRO, N. B. et al. Development of hybrid vesicular nanosystems composed of lipids and chitosan for octyl methoxycinnamate encapsulation. *Colloids and Surfaces A*, v. 608, p. 1-12, 2021.

CAVALU, S. et al. Surface modifications of the titanium mesh for cranioplasty using selenium nanoparticles coating, *Journal of Adhesion Science and Technology*, v. 32 (22), p. 2509-2522, 2018.

CHAUHAN, P.; CHAUDHARY S. Role of surface modification on selenium nanoparticles: Enumerating the optical, thermal and structural properties. *Optical Materials*, v. 97, p. 1-10, 2019.

CHEN, J. et al. Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 226, p. 1-11, 2020.

CHEN, W. et al. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 132, p. 574-581, 2015.

CHENGPENG, J. Synthesis, assembly, and integration of magnetic nanoparticles for nanoparticle-based spintronic devices. Thesis. University of Hong Kong, Pokfulam, Hong, 2017.

CHHABRIA, S.; DESAI, K. Selenium Nanoparticles and Their Applications. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 1, p. 1-32, 2016.

COLLINS, J. F.; KLEVAY, L. M. Copper. *Advances in Nutrition*.v. 2(6), p. 520-522, 2011.

CORREA, Carlos Alberto. Microscopia eletrônica de transmissão. In: CANEVAROLO JÚNIOR, Sebastião V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber Editora, 2003. P. 177-200.

CUNHA, F. A. B. Toxicidade de *Eugenia Uniflora L.* (Myrtaceai) em modelos de *Drosophila melanogaster* e células sanguíneas humanas. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2015.

DAVID, J.M. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

DHAND, C. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *RSC Adv.*, v. 5, p. 105003-105037, 2015.

DIN, M. I.; REHAN, R. Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles, *Analytical Letters*, v. 50 (1), p. 50-62, 2017.

DORFS, D. et al. Reversible Tunability of the Near-Infrared Valence Band Plasmon Resonance in Cu_{2-x}Se Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 133, p. 11175-11180, 2011.

DUMORE, N. S. MUKHOPADHYAY, M. Antioxidant properties of aqueous selenium nanoparticles (AseNPs) and its catalysts activity for 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reduction. *Journal of Molecular Structure*, v. 1205, p. 1-12, 2020.

EALIAS, A. M.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterization, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, v. 263, p. 1-15, 2017.

EKENNIA, A. et al. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using leaf extracts of *Alchornea laxiflora* and its tyrosinase inhibition and catalytic studies. *Micron*, v. 141, p. 1-9, 2021.

EL-DEEB, B. et al. Biological Synthesis and Structural Characterization of Selenium Nanoparticles and Assessment of Their Antimicrobial Properties. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, v. 45 (1), p. 135-170, 2018.

ELEMIKE, E. E. et al. Green synthesis of Ag, Au and Ag-Au bimetallic nanoparticles using *Stigmaphyllon ovatum* leaf extract and their in vitro anticancer potential. *Materials Letters*, v. 243, p. 148-152, 2019.

EL-GHAZALY, Anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles on the inflammation induced in irradiated rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 95 (2), p. 101-110, 2017.

EL-HAGARY, M. et al. The particle size-dependent optical band gap and magnetic properties of Fe-doped CeO_2 nanoparticles. *Solid State Sciences*, v. 91, p. 15-22, 2019.

ESTEVEZ, H. et al., Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 122, p. 184-193, 2014.

FDA (Food and Drug Administration). Department of Health, Education and Welfare. USA: Sunscreen drug products for over-the-counter drugs: proposed safety, effective and labeling conditions. Federal register. 43/166. 1978; 38206-69.

FDA (Food and Drug Administration). Sunscreen: How to Help Protect Your Skin from the Sun. Food and drug (2017). Disponível em <<https://www.fda.gov/drugs/understanding-over-counter-medicines/sunscreen-how-help-protect-your-skin-sun>> acesso em 27 de novembro de 2020.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. *Química Nova*, v. 30, (1), p. 153-158, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. Dietary reference in takes for vitamin A, vitamin K, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum,

nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, D.C.: National Academy Press, p. 224-257, 2001.

GRANJA, B. S. Exploring MBTH as spectrophotometric probe for total phenolic compounds determination in beverage samples. *Analytical Methods*, v. 10, p. 2197-2204, 2018.

GONG, L. J. et al. Resonance light scattering technique for sensitive detection of heparin using plasmonic Cu₂-xSe nanoparticles. *Talanta*, v. 216, p. 1-7, 2020.

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. *Quim. Nova*, v. 32 (3), p. 717-721, 2009.

GUBITOSA, J. Multifunctional green synthesized gold nanoparticles/chitosan/ellagic acid self-assembly: Antioxidant, sun filter and tyrosinase-inhibitor properties. *Materials Science & Engineering C*, v.10, p. 1-13, 2020.

GUIMARÃES, A. S. Compostos naftoquinônicos: Atividade biológica, fotoprotetora e estudos de interação com ctDNA. Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2019.

GUO, L. HUANG, K. LIU, H. Biocompatibility selenium nanoparticles with an intrinsic oxidase-like activity, *J. Nanoparticle Res.*, v.18, p. 74, 2016.

GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, J.M. et al. Use of Agave tequilana-lignin and zinc oxide nanoparticles for skin photoprotection. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. V. 163, p. 156-161, 2016.

HEERA, P; SHANMUGAM, S. Nanoparticle Characterization and Application: An Overview. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, v. 4 (8), p. 379-386, 2015.

HEMALATHA, T. et al. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite-Coated Selenium Nanoparticles and their Interaction with Osteosarcoma (SaOS-2) Cells. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, v. 27, p. 1152-1158, 2014.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, H. et al. Impact of Selenium and Copper Nanoparticles on Yield, Antioxidant System, and Fruit Quality of Tomato Plants. *Plants*, v. 8 (355), 1-17, 2019.

HU, S. et al. Laser synthesis and size tailoring of carbon quantum dots. *J. Nanopart. Res.*, v. 13, p. 7247-7252, 2011.

HOSNEDLOVA, B. et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int. J. Nanomedicine*, v. 13, p. 2107-2128, 2018.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, G.; LU, C.; YANG, H. Novel Nanomaterials for Biomedical, Environmental and Energy Applications. *Micro and Nano Technologies*, v. 3, p. 89-109, 2019.

HUNG, N. D.; CONG, T. V.; TRANG, H. N. Synthesis of bimetallic Cu-Ag nanoparticles prepared by DC high voltage electrochemical method. Vietnam J. Chem., v. 57 (5), p. 609-614, 2019.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academy Press, 2000.

IRAVANI, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. Research in pharmaceutical sciences, v. 9 (6), p. 385-406, 2014.

JALALIAN, S. H. et al. Targeted co-delivery of epirubicin and NAS-24 aptamer to cancer cells using selenium nanoparticles for enhancing tumor response in vitro and in vivo. Cancer Letters, v. 4161, p. 87-93, 2018.

JAMKHANDE, P. G. et al. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. Journal of Drug Delivery Science and Technology. V. 53 (1011742), p.1-11, 2019.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. Beilstein J. Nanotechnol., v. 9, p. 1050-1074, 2018.

KANG, S. et al. Graphene Oxide Quantum Dots Derived from Coal for Bioimaging: Facile and Green Approach. Scientific Reports, v. 9 (4101), p. 1-7, 2019.

KAUR, K.; RATH, G. Formulation and evaluation of UV protective synbiotic skin care topical formulation. Journal of Cosmetic and Laser Therapy. V. 1, p.1-11, 2019.

KETATA, E. et al. Anti-melanogenesis potential of a new series of Morita-Baylis-Hillman adducts in B16F10 melanoma cell line. Bioorganic Chemistry. v. 84. p. 17-23, 2019.

KHALID, A. et al. Intrinsic fluorescence of selenium nanoparticles for cellular imaging applications Nanoscale, v. 8, p. 3376-3385, 2016.

KHAN, S. A. Green synthesis of ZnO and Cu-doped ZnO nanoparticles from leaf extracts of *Abutilon indicum*, *Clerodendrum infortunatum*, *Clerodendrum inerme* and investigation of their biological and photocatalytic activities. Materials Science & Engineering C, v. 82, p. 46-59, 2018.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry, v. 12 (7), p. 908-931, 2019.

KHAN, N. T.; JAMEEL, M. Copper Nanoparticles-Synthesis and Applications. Acta Scientific Pharmaceutical Sciences, v. 2 (12), p. 41-43, 2018.

KHIRALLA, G. M.; EL-DEEB, B. A. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some food borne pathogens. LWT-Food Science and Technology, v. 63, p. 1001-1007, 2015.

KHURANA, A. et al. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 111, p. 802-812, 2019.

KOKILA, K.; ELAVARASAN, N.; SUJATHA, V. *Diospyros montana* leaf extract-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their biological applications. *New J. Chem.*, v. 41, p. 7481-7490, 2017.

KONG, H. et al. Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 65, p. 155-162, 2014.

KUMAR, B., KAUR, G., RAI, S. B. Sensitized green emission of terbium with dibenzoylmethane and 1, 10 phenanthroline in polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blends. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 187, p. 75-81, 2017.

KUMAR, V. et al. Efficient UV photodetectors based on Ni-doped ZnS nanoparticles prepared by facial chemical reduction method. *Physica B: Condensed Matter*, v. 575, p. 1-11, 2019.

LARANJEIRA, N. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim. Nova*, v. 32 (3), p. 672-678, 2009.

LIU, Y. et al. Synthesis and antidiabetic activity of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides from *Catathelasma ventricosum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p. 632-639, 2018.

LIU, Y. et al. Improved therapeutic efficiency of photothermal treatment and nursing care in prostate cancer by DOX loaded PEG coated Cu@Se nano-hybrid vesicle. *ProcessBiochemistry*, v. 92, p. 78-84, 2020.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quim. Nova*, v. 27 (4), p. 670-673, 2004.

LOPEZ-HERAS, I. et al. Effect of Chitosan-Stabilized Selenium Nanoparticles on Cell Cycle Arrest and Invasiveness in Hepatocarcinoma Cells Revealed by Quantitative Proteomics. *J NanomedNanotechnol*, v. 5 (5), p. 1-9, 2014.

LORCA, B. S. S. Desenvolvimento de formulação fotoprotetora contendo nanopartículas poliméricas com filtro solar. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2012.

LYONS, A. B. et al., Photoprotection beyond ultraviolet radiation: A review of tinted sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 1, p. 1-5, 2020.

MA, X. et al. Lucigenin fluorescent assay of tyrosinase activity and its inhibitor screening. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, v. 280, p. 41-45, 2019.

MAL, J. Microbial Synthesis of Chalcogenide Nanoparticles: Combining Bioremediation and Biorecovery of Chalcogen in the Form of Chalcogenide Nanoparticles. 1st English Edition. CRC Press / Balkema, 2018.

MALHOTRA, S.; JHA, N.; DESAI K. A Superficial Synthesis of Selenium Nanospheres Using Wet Chemical Approach, *Int. J. Nanotechnol. Appl.* v. 4 (2), p. 7-14, 2014.

MALI, S. C.; RAJ S.; TRIVEDI, R. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 20, p. 1-6, 2019.

MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *AnBras Dermatol*, v. 61, p. 121-124, 1986.

MATES, I. et al. Selenium nanoparticles: production, characterization and possible applications in biomedicine and food Science. *U.P.B. Sci. Bull. Series B*, v. 81 (1), p. 205-216, 2019.

MAZHAR, T.; SHRIVASTAVA, V.; TOMAR, R. S. Green Synthesis of Bimetallic Nanoparticles and its Applications: A Review. *J. Pharm. Sci. & Res.*, v. 9 (2), p. 102-110, 2017.

MELLINAS, C.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using *Theobroma cacao* L. Bean Shell Extract. *Molecules*, v. 24, p. 1-20, 2019.

MENON, S. et al. Selenium nanoparticles: A potent chemotherapeutic agent and an elucidation of its mechanism. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 170, p. 280-292, 2018.

MITTAL, A. K.; KUMAR, S.; BANERJEE, U. C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 431, p. 194-199, 2014.

M-M, P. et al. Flow field-flow fractionation for particle size characterization of selenium nanoparticles incubated in gastrointestinal conditions, *Food Research International*, v. 57, p. 203-209, 2014.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. et al. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicol Sci.*, v. 123 (1), p. 264-80, 2011.

NAIIM, M. et al. Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter*, v. 11, p. 28-32, 2015.

NAIR, B.; PRADEEP, T. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Crystal Growth & Design*, v. 2, p. 293-298, 2002.

NAIRN, R.; CRESSWELL, W.; NAIRN, J. Mushroom Tyrosinase: A Model System to Combine Experimental Investigation of Enzyme-Catalyzed Reactions, Data Handling Using R, and Enzyme-Inhibitor Structural Studies. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 43(5), p. 370-376, 2015.

NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. *Rev. Virtual de Química*, v. 6. (2), p. 190-223, 2013.

NASRABADI, H. T. et al. Bimetallic nanoparticles: Preparation, properties, and biomedical applications, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44 (1), p. 376-380, 2016.

NENAVATHU, B. P.; SHARMA, A.; DUTTA, R. K. Se doped ZnO nanoparticles with improved catalytic activity in degradation of Cholesterol. *J. Water Environ. Nanotechnol.*, v. 3 (4), p. 289-300, 2018.

NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M. S.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 61 (4), p. 685-692, 2009.

NIKOLIĆ, S. et al. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 414, p. 276- 284, 2011.

NOMURA, D. A. et al. Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems. In: *XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica*, Córdoba, Argentina, 2013.

NOURI, M. et al. S-doping effects on optical properties and highly enhanced photocatalytic performance of Cu_3Se_2 nanoparticles under solar-light irradiation. *Ceramics International*, v. 43, p. 14983-14988, 2017.

NUNES, A. M. Preparação de nanoestruturas híbridas de ouro e seus efeitos na bioenergética mitocondrial. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2017.

OLIVEIRA, W. S. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante em amostras de bebidas e própolis vermelha de alagoas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2016.

OLIVEROS, M. E. M. Produção e Caracterização Analítico/Estrutural/Propriedades de Nanocompósitos Cu-MWCNT. Tese de doutorado. PUC. Rio de Janeiro. 2012.

OREMLAND, R. S. et al. Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70 (1), p. 52-60, 2004.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem& Anal Biochem*, v1 (1), p. 1-10, 2011.

POLTE, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm*, v. 17, p. 6809-6830, 2015.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

QIU, W. et al. Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin-decorated selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 170, p. 692-700, 2018.

RAHIMAN, A.F.S. A.; SETHUMANICKAM, S. Corrosion inhibition, adsorption and thermodynamic properties of poly(vinyl alcohol-cysteine) in molar HCl. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 10, p. S3358-S3366, 2017.

RAMAMURTHY, C. H. et al. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 36, p. 1131-1139, 2013.

RAO, A. R., et al. Effective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 61(16), p. 3842-3851, 2013.

RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Elemento químico: Cobre. *Química nova na escola*, v. 34 (3), p. 161-162, 2012.

SAKR, T. M.; KORANY, M. KATTI, K. V. Selenium nanomaterials in biomedicine—An overview of new opportunities in nanomedicine of selenium. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 46, p. 223-233, 2018.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. *An. Bras. Dermatol.*, v. 86 (3), p. 507-515, 2011.

SCHLADT, T. D. et al. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton Trans.*, v. 40, p. 6315-6343, 2011.

SCHALKA, S., DONATO, L. C. Evaluation of effectiveness of a sunscreen containing *Polypodium leucatomos* extract in reducing the sun damage to the skin. *Surg Cosmet Dermatol.*, v.11 (4), p. 310-8, 2019.

SCIMECA, M. et al. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, v. 62 (2841), p. 1-10, 2018.

SCOTOGNELLA, F. et al. Plasmon Dynamics in Colloidal Cu_{2-x}Se Nanocrystals. *Nano Lett.*, v. 11, p. 4711-4717, 2011.

SHAN, B. et al. High-Quality Dual-Plasmonic $\text{Au}@\text{Cu}_{2-x}\text{Se}$ Nanocrescents with Precise Cu_{2-x}Se Domain Size Control and Tunable Optical Properties in the Second Near-Infrared Biowindow. *Chem. Mater.*, v. 31, p. 9875-9886, 2019.

SHARMA, G. et al. Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. *Journal of King Saud University – Science*, v. 31, p. 257-269, 2019.

SHAW, J. C. Copper deficiency and non-accidental injury. *Arch. Dis. Child.* v. 63(4), p. 448-455, 1988.

SHAYESTEH, S. F.; DIZGAH, A. A. Effect of doping and annealing on the physical properties of ZnO:Mg nanoparticles. *Pramana – J. Phys.*, v. 81 (2), p. 319-330, 2013.

SHEN, Y. H. et al. Synthesis of dextran/Se nanocomposites for nanomedicine application. *Materials Chemistry and Physics*, v. 109 (2-3), p. 534-540, 2008.

SHITU, I. G. et al. Influence of tartaric acid concentration on structural and optical properties of CuSe nanoparticles synthesized via microwave assisted method. *Results in Physics*, v. 17, p. 1-12, 2020.

SIGUERO, M. P. Síntesis, caracterización y biotransformación de nanopartículas de selenio: aplicación al desarrollo de envases antioxidantes. Tese de doutorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 2016.

SILVÉRIO, M. D. O., CASTRO, C. F. S., MIRANDA, A. R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.15 (1), p.59-65, 2013.

SINGH, A. et al. Highly facile and rapid one-pot synthetic protocol for the formation of Se nanoparticles at ambient conditions with controlled phase and morphology: role of starch and cytotoxic studies. *Mater. Res. Express*, v. 6, p. 1-10, 2019.

SKALICKOVA, S. et al. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, v. 33, p.83-90, 2017.

SONG, X. et al. Effect of molecular weight of chitosan and its oligosaccharides on antitumor activities of chitosan-selenium nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 235, p. 1-11, 2020.

SOUSA FILHO, P. C.; SERRA, O. A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. *Quim. Nova*, v. 38 (5), p. 679-696, 2015.

SOUZA-PEREIRA, D. et al. Synthesis and biological evaluation of N-aryl-2-phenylhydrazinecarbothioamides: Experimental and theoretical analysis on tyrosinase inhibition and interaction with HSA. *Bioorganic Chemistry*, v. 81, p. 79-87, 2018.

TERNES, N. M. M. *Drosophila melanogaster*: Um modelo alternativo para o estudo dos efeitos bioquímicos e comportamentais causados pela exposição ao manganês durante o desenvolvimento embrionário. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pampa. São Gabriel. 2014.

VAHDATI, M.; MOGHADAM, T. T. Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles Lysozyme Nanohybrid System with Synergistic Antibacterial Properties. *Scientific Reports*, v. 10 (510), p. 1-10, 2020.

VELASCO, M. V. R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 32(1), p. 27-34, 2011.

- VENNILA, K. et al. Comparison of biological activities of selenium and silver nanoparticles attached with bioactive phytoconstituents: green synthesized using *Spermacoce hispida* extract. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, v. 9, p. 1-10, 2018.
- VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) *Pure Appl. Chem.*, v. 84, p. 377-410, 2012.
- VIEIRA, A. P. et al. "Sweet Chemistry": a Green Way for Obtaining Selenium Nanoparticles Active against Cancer Cells. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 28 (10), p. 2021-2027, 2017.
- VINKOVIĆ VRČEK, I. Selenium Nanoparticles: Biomedical Applications. In: Michalke B. (eds) *Selenium. Molecular and Integrative Toxicology*. Springer, 2018.
- VYAS, J., RANA, S. Antioxidant activity and green synthesis of selenium nanoparticles using *Allium sativum* extract. *International Journal of Phytomedicine*, v. 9 (4), p. 634-641, 2017.
- WADHWAN, S. A. et al. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 100, p. 2555-2566, 2016.
- WANG, L. et al. Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles–chitosan composite particles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 2685-2696, 2015.
- WANG T. et al., Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids Surf. B: Biointerf.*, v. 80, p. 94-102, 2010.
- WANG, X. et al. Highly selective hydrogenation of α -pinene in aqueous medium using PVA-stabilized Ru nanoparticles. *Molecular Catalysis*, v. 444, p. 62-69, 2019.
- WIKRAM, P. et al. Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, v. 9 (7), p. 527-544, 2017.
- WILSON, B. D.; MOON, S.; ARMSTRONG, F. Comprehensive Review of Ultraviolet Radiation and the Current Status on Sunscreens. *J. Clin Aesthet Dermatol.*, v. 5 (9), p. 18-23, 2012.
- WOLF, A. et al. Synthesis of Plasmonic Cu_{2-x}Se@ZnS Core@Shell Nanoparticles. *Chem. Phys. Chem.*, v. 17, p. 717-723, 2016.
- WONG, P. T.; CHOI, S. K. Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic Delivery Systems. *Chemical Reviews*, v. 115 (9), p. 3388-3432, 2015.
- WORSFOLD, P. J. SPECTROPHOTOMETRY: Overview. *Encyclopedia of Analytical Science*, p. 318-321, 2005
- XIAO, F. et al. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, v. 1 (1), p. 60-69, 2020.

XIAO, Y. et al. Construction of a *Cordyceps sinensis* exopolysaccharide-conjugated selenium nanoparticles and enhancement of their antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 99, p. 483-491, 2017.

XIONG, J. et al. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid. *Green Chem.*, v.13, p. 900-904, 2011.

YAN, J. et al. Fabrication and stabilization of biocompatible selenium nanoparticles by carboxylic curdlans with various molecular properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 179, p. 19-27, 2018.

YAZHINIPRABHA, M.; VASEEHARAN B. *In vitro* and *in vivo* toxicity assessment of selenium nanoparticles with significant larvicidal and bacteriostatic properties. *Materials Science & Engineering C*, v. 103, p. 1-13, 2019.

YEAGER, D. G., LIM, H. W. What's New in Photoprotection: A Review of New Concepts and Controversies. *Dermatol Clin*, v. 37, p. 149-157, 2019

YEFRIDA, H. A. et al. Modification of Phenanthroline Method to determine Antioxidant Content in Tropical Fruits Methanolic Extract. *Res. J. Chem. Environ.* v. 22 (4), p.28-35, 2018.

YESMURZAYEVA, N. et al. "Synthesis and characterization of catalysts based on bimetallic nanoparticles," 2016 International Conference on Nanomaterials: Application & Properties (NAP), LVIV, 2016, pp. 02NSA08-1-02NSA08-4.

ZENG, S. et al. Synthesis and antidiabetic properties of chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 170, p. 115-121, 2018.

ZENG, D. et al. Potentiation of in Vivo Anticancer Efficacy of Selenium Nanoparticles by Mushroom Polysaccharides Surface Decoration. *J. Agric. Food Chem.*, v. 67 (10), p. 2865-2876, 2019.

ZHAI, X. et al. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *J Nanobiotechnol*, v. 15 (4), p. 1-12, 2017.

ZHANG J. et al., 2004. A new method for the synthesis of selenium nanoparticles and the application to construction of H₂O₂ biosensor. *Chin Chem Lett*, v. 15, p. 1345-1348, 2004a.

ZHANG, J. et al. Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of selenoenzymes in both cultured cells and mice. *Life Sciences*. v. 75 (2), p. 237-244, 2004b.

ZHANG, C. et al. Synthesis, characterization, and controlled release of selenium nanoparticles stabilized by chitosan of different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, v. 134, p. 158-166, 2015.

ZHANG, J. et al. Development, physicochemical characterization and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by beta-lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 1406-1413, 2018a.

ZHANG, H.; OKUNI, J.; TOSHIMA, N. et al. One-pot synthesis of Ag–Au bimetallic nanoparticles with Au shell and their high catalytic activity for aerobic glucose oxidation. / *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 354, p. 131-138, 2011.

ZHANG, H. et al. Synergistic combination of PEGylated selenium nanoparticles and X-ray-induced radiotherapy for enhanced anticancer effect in human lung carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 107, p. 1135-1141, 2018b.

ZHENG, S. et al. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p. 3939-3949, 2012.

ZHU, C. et al. Selenium nanoparticles decorated with *Ulva lactuca* polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- κ B mediated hyper inflammation. *J Nanobiotechnol*, v. 15 (20), p. 1-15, 2017.

ZHU, Q. et al. Microwave Synthesis of Cuprous Oxide Micro-/Nanocrystals with Different Morphologies and Photocatalytic Activities. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 27 (4), p. 289-295, 2011.