



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
INDUSTRIAL**



NÍCOLAS LOPES DE MENEZES

**INFLUÊNCIA DE NANOBASTÕES DE OURO NA CADEIA
TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS**

Maceió-AL
2018

NÍCOLAS LOPES DE MENEZES

**INFLUÊNCIA DE NANOBASTÕES DE OURO NA CADEIA
TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como pré-requisito para obtenção de graduação em Química Tecnológica e Industrial.

Orientadora: Dra. Ana Catarina Rezende Leite

Coorientador: Ábner Magalhães Nunes

Maceió-AL
2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTOR: NÍCOLAS LOPES DE MENEZES

INFLUÊNCIA DE NANOBASTÕES DE OURO NA CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

Monografia de trabalho de conclusão de curso submetido ao corpo docente da Graduação em Química Tecnológica e Industrial do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em ____/____/____.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite – IQB/UFAL (Orientadora)

Msc. Ábner Magalhães Nunes – IQB/UFAL (Coorientador)

Profa. Dra. Camila Souza Porto – Penedo/UFAL

Profa. Dra. Rusiene Monteiro de Almeida, IQB/UFAL

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, curiosidade e perseverança para, entre outras coisas, entender a ciência que denota como o Senhor construiu o mundo.

Aos meus pais e demais familiares pelo apoio e suporte na conquista dos meus sonhos. Vocês foram cruciais para que eu não desistisse quando os obstáculos da vida pareciam intransponíveis.

Aos meus amigos pela ajuda e companheirismo nos momentos felizes e difíceis. Momentos estes que sempre lembrarei. Espero de algum modo ter sido tão importante na vida de vocês como vocês foram para a minha.

Aos professores da UFAL, sobretudo a minha orientadora e coorientador, pela paciência, esclarecimentos e dedicação enquanto me guiavam no caminho do saber. Que vocês preservem essas qualidades e encantem cada vez mais alunos assim como me encantaram. Muito sucesso a todos vocês na profissão.

Ao Laboratório de Bioenergética (LaBio), Laboratório de Metabolismo e Proteômica (LAMP), Grupo de Catálise e de Reatividade Química (GCaR) e Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR) por todo o suporte prestado. E aos órgãos de fomento: CNPq, FAPEAL e CAPES; pelo financiamento.

“Num dado dia, em dada circunstância, você tem um limite. E você busca esse limite. Então, toca o limite e diz: “Certo, este é o limite.” Todavia, quando o alcança, algo acontece... e você percebe que pode ir mais longe! Com sua mente, sua determinação, seu instinto e sua experiência, você pode tentar mais alto”.

AYRTON SENNA

RESUMO

Os nanomateriais apresentam propriedades distintas que dependem fortemente da forma e tamanho das partículas que os constituem. Devido a essas propriedades, cada vez mais pesquisadores se dedicam a explorar novas aplicações para essas estruturas. Algumas delas apresentam finalidades terapêuticas, principalmente em alguns tipos de neoplasias, e tal mecanismo está muitas vezes ligado à indução da morte celular. Tendo em vista que as mitocôndrias constituem o principal maquinário responsável pelo metabolismo celular e estão diretamente envolvidas na morte celular, seja por necrose ou por apoptose, elas são um excelente alvo de pesquisa. Sendo assim, este trabalho visa investigar a influência de nanobastões de ouro (AuNRs) nessas organelas, avaliando especificamente o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e possíveis modificações estruturais. Com esta finalidade, mitocôndrias de fígado de ratos foram isoladas e, em seguida, essa suspensão mitocondrial foi exposta a nanobastões de ouro (AuNRs) recobertos com albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μM) onde a cadeia transportadora de elétrons foi avaliada através do consumo de oxigênio mitocondrial e através da microscopia eletrônica de transmissão para identificação de possíveis alterações estruturais. Os resultados indicaram que os AuNRs foram capazes de levar a um comprometimento do consumo de oxigênio mitocondrial através da diminuição do estado de fosforilação (V_3) e do estado desacoplado (V_{CCCP}). Esses eventos reduziram, conseqüentemente, o controle respiratório das mitocôndrias, parâmetro que mede a viabilidade mitocondrial. Os resultados também comprovaram que a capacidade deletéria dos AuNRs se expressa de forma dose-dependente. Além disso, os nanobastões foram capazes de provocar uma desorganização das cristas mitocondriais e descolamento das membranas. Essa interrupção da função mitocondrial pode induzir a morte celular, demonstrando, por mais que inicial, uma possível aplicação terapêutica.

Palavras chaves: nanobastões de ouro, mitocôndrias, cadeia transportadora de elétrons, morte celular

ABSTRACT

Nanomaterials have distinct properties that depend strongly on the shape and size of the particles that make them up. Because of these properties, more and more researchers are exploring new applications for these structures. Some of them have therapeutic purposes, mainly in some types of neoplasias, and such mechanism is often linked to the induction of cell death. Considering that mitochondria are the main machinery responsible for cell metabolism and are directly involved in cell death, either through necrosis or apoptosis, they are an excellent research target. Thus, this work aims to investigate the influence of gold nanorods (AuNRs) on these organelles, specifically evaluating the operation of the electron transport chain and possible structural modifications. To this end, mitochondria of rat liver were isolated, and then this mitochondrial suspension was exposed to gold nanorods (AuNRs) coated with bovine serum albumin (BSA) at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μM) where the electron transport chain was evaluated through mitochondrial oxygen consumption and transmission electron microscopy to identify possible structural changes. The results indicated that AuNRs were able to lead to impairment of mitochondrial oxygen uptake through decreased phosphorylation state (V_3) and decoupled state (V_{CCCP}). These events consequently reduced the respiratory control of mitochondria, a parameter that measures mitochondrial viability. The results also showed that the deleterious capacity of AuNRs is expressed in a dose-dependent manner. In addition, the nanorods were able to cause a disorganization of the mitochondrial ridges and detachment of the membranes. This interruption of mitochondrial function may induce cell death, demonstrating, however initial a possible therapeutic application.

Keywords: gold nanorods, mitochondria, electron transport chain, cell death

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Cores das soluções de ouro coloidal em função do tamanho das nanopartículas.....	17
Figura 02 – Micrografias de diferentes formas geométricas de nanopartículas em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Nanoesferas, nanopirâmides, nanobastões, nanoprismas e nanohastes, respectivamente.....	17
Figura 03 – Dinâmica de formação de nanobastões de ouro pelo método mediado por semente.....	19
Figura 04 – Interação da luz com uma nanopartícula esférica promovendo a oscilação coletiva dos elétrons.....	20
Figura 05 – Bandas correspondentes à ressonância de plásmom de superfície de nanopartículas de ouro (A) esféricas e (B) bastões.....	20
Figura 06 – Esquema da equação química responsável entre a interação Au-S.....	21
Figura 07 – (A) Deslocamento na região do infravermelho próximo dos nanobastões de ouro incubados com albumina sérica bovina (BSA) e (B) esquema de interação do BSA com os nanobastões.....	22
Figura 08 – Estrutura química (A) e modelo molecular tridimensional (B) do trifosfato de adenosina (ATP), com base em dados de difração de raios-x.....	23
Figura 09 – Hepatócitos isolados por técnica de perfusão hepática utilizando colagenase, fixados e corados por hematoxilina/eosina. Aumento de 1000 vezes.....	24
Figura 10 – Estrutura (A) e secção transversal vista em microscopia eletrônica (B) de uma mitocôndria.....	26
Figura 11 – Modelo quimiosmótico mostrando o fluxo de elétrons entre os complexos enzimáticos (cadeia transportadora de elétrons), com conseqüente geração de um potencial químico e elétrico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. E a passagem de H^+ para matriz devido a essa diferença de potencial gerando ATP a partir de ADP e P_i (fosforilação oxidativa).....	28
Figura 12 – Representação do método de avaliação da fosforilação oxidativa através da respiração mitocondrial de acordo com a metodologia estabelecida por Chance e Willians (1955). No qual os espaços delimitados de vermelho representam os principais estados da	

respiração mitocondrial utilizados para avaliação da interferência de compostos sobre a fosforilação oxidativa.....	30
Figura 13 – Desacoplamento da transferência de elétrons e da síntese de ATP por ação do desacoplador químico FCCP (à esquerda) e a dissociação do seu próton (à direita).....	32
Figura 14 – Mecanismo do processo de morte celular programada (apoptose).....	34
Figura 15 – (A) Espectro de UV-Vis dos nanobastões de ouro sintetizados e (B) sua respectiva microscopia eletrônica de transmissão.....	42
Figura 16 – Espectros de UV-Vis de nanobastões de ouro. (A) Comparação antes e após a lavagem e (B) comparação com os AuNRs tratados com BSA.....	43
Figura 17 – A presença dos AuNRs provocou uma diminuição no oxigênio consumido de forma dose-dependente. A figura é representativa de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. $p < 0,05$. MITO = mitocôndria, OLIGO = oligomicina.....	43
Figura 18 – Consumo de oxigênio nos estados III, IV e V_{FCCP} (A), Controle Respiratório e Razão ADP/O (B). As barras representam a média \pm S.D. ($n = 3$). $p < 0,05$. OLIGO = oligomicina.....	44
Figura 19 – Influência de AuNRs na morfologia de mitocôndrias isoladas por imagens de microscopia de transmissão. Imagens representativas de mitocôndrias controle (A) e com tratamento (B) de nanobastões de ouro a $100\mu\text{M}$. Escala de 500 nm.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Relação de reagentes e solventes utilizados no trabalho.....	37
--	----

ABREVIATURAS

ΔG°	variação de energia livre de Gibbs
ΔpH	variação de potencial de hidrogênio
$\Delta\Psi$	variação de potencial elétrico
ADP	adenosina difosfato
AIF	fator indutor de apoptose
ANT	translocador de nucleotídeos de adenina
Apaf-1	fator ativador de proteases pró-apoptóticas
Asp	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
AuNRs	nanobastões de ouro
BSA	albumina sérica bovina
PTPM	poro de transição de permeabilidade mitocondrial
CCCP	carbonilcianeto- <i>m</i> -clorofenilidrazona
CsA	ciclosporina A
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
Cys	cisteína
EGTA	ácido etileno glicol tetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	flavina-adenina dinucleotídeo reduzido
FCCP	carbonilcianeto- <i>p</i> -trifluorometoxifenilidrazona
G°	energia livre de Gibbs
GSH	glutationa reduzida
GTP	guanosina trifosfato
M _r	massa molecular relativa
MET	microscopia eletrônica de transmissão

NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
P _i	fosfato inorgânico
Q	ubiquinona
QH·	semiquinona
QH ₂	ubiquinol
RPS	ressonância de plásmon de superfície
SI	solução contendo piruvato, glutamato, α -cetogluturato, malato
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
UCP	<i>uncoupling protein</i> , proteína desacopladora em português

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 NANOMATERIAIS.....	14
2.2 NANOBASTÕES DE OURO.....	18
2.3 METABOLISMO E MITOCÔNDRIA.....	22
2.4 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA.....	26
2.5 MORTE CELULAR.....	32
3.0 OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.2 MÉTODOS.....	38
4.2.1 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS.....	38
4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	39
4.2.3 EXPOSIÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS AOS NANOBASTÕES DE OURO.....	40
4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASSMISSÃO (MET).....	40
4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6.0 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1.0 INTRODUÇÃO

Desde a revolução tecnológica do século XX, o homem vem buscando produzir objetos de consumo cada vez menores, fenômeno denominado de miniaturização (IDGNOW, 2018). Hoje é facilmente possível observá-lo em aparelhos eletrônicos como celulares, *smartphones* e, principalmente, computadores (BASF, 2018). Atualmente estes aparelhos estão processando informações cada vez mais rápido, realizando mais funções e incrivelmente, ocupando menores dimensões (CARLES; HERMOSILLA, 2008).

Richard Feynman, Nobel de Física de 1965, já havia dito que como os materiais que nos rodeiam são feitos de átomos, o limite de miniaturização de um dispositivo seria alcançado quando o tamanho dos seus componentes fosse pouco maior que o dos átomos. O raio atômico teórico do carbono, por exemplo, mede 67 picômetros, que equivale a 0,00000000067 metros (ASTRONOO, 2018). Em 1959, ministrando uma palestra intitulada “Há mais espaços lá embaixo”, Feynman sugeriu a manipulação da matéria em escala atômica encorajando vários estudante a se lançarem em uma área até então desconhecida, mas que ele considerava promissora. Assim ele foi um dos primeiros a descrever o que atualmente conhecemos como nanociência (FEYNMAN, 1960).

A nanociência é a ciência que estuda os materiais cujos tamanhos de suas partículas encontram-se na faixa dos nanômetros, que equivalem a 10^{-9} m. Esses nanomateriais, que podem se apresentar de diversos tamanhos e formas, possuem ao menos uma dimensão na escala nanométrica, abaixo do tamanho crítico capaz de lhes conferir novas propriedades (ZARBIN, 2007). Com isso, uma gama de aplicações pode ser explorada tornando essa classe de materiais uma das mais promissoras (DÚRAN, 2007).

Dispositivos eletrônicos com maior sensibilidade, cosméticos com maior eficiência, e fármacos com maior seletividade são alguns dos benefícios que a nanotecnologia promete trazer à sociedade. Contudo, talvez seja nesta última área, a terapêutica, que a nanotecnologia demonstre sua incrível capacidade de inovação e benefício à humanidade. De fato, devido a suas propriedades particulares, nanopartículas de ouro têm sido amplamente estudadas na terapêutica de diversas patologias, inclusive do câncer (WANG et al., 2011). O câncer, manifestada sob vários tipos é a patologia, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), responsável por 8,2 milhões de mortes a cada ano, 13% de todas as mortes no mundo todo. No Brasil a expectativa é de 1,2 milhão de novos casos de câncer entre 2018 e 2019. Segundo

a Organização Mundial da Saúde (OMS), apesar do enorme investimento em seu combate o número de novos casos de câncer continuará aumentado.

Assim, o câncer se tornou uma das patologias mais temida em todo o globo e, conseqüentemente, vários estudos têm como finalidade encontrar um tratamento cada vez mais eficaz para tal. Nesse intuito, Wang e colaboradores (2011) demonstraram em um estudo a ação anticancerígena de nanobastões de ouro revestidos com albumina sérica bovina (BSA) causando morte de células tumorais através de danos mitocondriais. Essas estruturas demonstraram seletividade por células cancerígenas não afetando células normais.

A mitocôndria é uma organela presente no citoplasma, muito importante no processo metabólico, pois apresenta como principal finalidade a produção de energia na forma de moléculas de ATP, necessária para a realização das funções vitais da célula. A produção dessa molécula ocorre através do acoplamento do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa que ocorrem nos complexos enzimáticos existentes na mitocôndria (NICHOLLS, 2013).

Com a finalidade de desenvolvimento de novas terapias seletivas alternativas, as diferenças metabólicas em uma célula tumoral, tais como o redirecionamento da glicose descrito por Hay (2016), podem ser exploradas. As células tumorais dependem em maior proporção da via glicolítica para geração de ATP e o uso de um inibidor dessa via pode desencadear a morte destas células. Assim, possuindo um papel importante tanto no metabolismo da glicose, quanto no processo de indução de morte celular, a mitocôndria constitui-se um alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas de combate ao câncer (SHIM et al. 1997).

Dessa forma, o presente estudo se propôs a investigar como nanoestruturas podem afetar a geração de ATP, através da avaliação, *in vitro*, da influência de nanobastões de ouro na cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOMATERIAIS

Atualmente a utilização de diferentes materiais em diversas atividades humanas é bastante disseminada. Seja para a obtenção de novas propriedades, características e funções, ou para o melhoramento das mesmas, o homem vem pesquisando ao longo do tempo novos

materiais. A utilização, domínio, desenvolvimento e exploração destes materiais têm uma profunda influência no desenvolvimento social e estão relacionadas a aspectos socioeconômicos, culturais, geográficos, demográficos, ambientais, entre outros (ZARBIN, 2007).

A relação entre a Química e os materiais é muito mais antiga que a própria Química (enquanto um ramo independente da ciência), apesar da existência e o reconhecimento da “Química de Materiais” como uma subdivisão da Química ser relativamente recente, entre os anos de 1980-1990 (ZARBIN, 2007). A Química de Materiais se trata de uma área inter e multidisciplinar, que integra conhecimentos e habilidades das quatro divisões clássicas da Química e cruza as fronteiras entre a Química e a Física, a Química e a Biologia, a Química e as Engenharias. Sendo assim de ampla importância no estudo da Química e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da sociedade moderna (ZARBIN, 2007).

Esse campo de estudo classifica os materiais em cinco diferentes categorias, de acordo com algumas de suas estruturas ou propriedades mais características, são eles: metais, polímeros, cerâmicas, semicondutores e compósitos. No qual os materiais metálicos são constituídos de elementos metálicos (puros ou em combinação, originando as chamadas ligas metálicas), como ferro, cobre, aço, bronze etc. Polímeros são compostos macromoleculares, de origem natural ou sintética, formados pela repetição de um grande número de unidades químicas estruturais. Semicondutores apresentam condutividade elétrica intermediária entre os metais e os isolantes, e mecanismo de condução diferenciado dos metais. E compósitos são materiais formados pela combinação de dois ou mais diferentes materiais, produzindo propriedades únicas e sinérgicas, diferentes daquelas de seus componentes individuais (ASKELAND, 1994).

Entretanto, nos últimos anos, nenhuma classe de materiais tem despertado tanto interesse quanto os materiais obtidos em escala nanométrica – os nanomateriais. O estudo de materiais cujos tamanhos das partículas que os constituem encontram-se na faixa dos nanômetros (nm que equivale a 10^{-9} metros) ganhou importância significativa a partir do final do século XX (GALEMBECK et al., 2003).

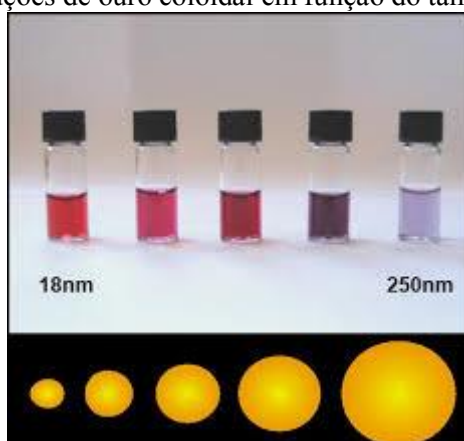
Essa ciência que já se mostrava tão promissora, hoje apresenta várias aplicações. Em cosméticos para uma melhor emulsão do produto, e assim permitir uma distribuição mais homogênea dos ingredientes ativos nas camadas da pele. Em fármacos para uma maior seletividade e eficiência do princípio ativo. Na eletrônica para aplicações que necessitem de escala nanométrica para maior sensibilidade e precisão. Produtos de limpeza no qual

nanopartículas de prata são usadas com atividade antibacteriana e desinfetante. Para reforçar materiais e diminuir sua densidade através da utilização de nanotubos de carbono. Em roupas para obtenção de superfícies superhidrofóbicas, autolimpantes e livres de odor. Para decomposição de contaminantes aéreos através de nanopartículas de dióxido de titânio. Entre outras aplicações como tintas, óculos de sol anti-reflexivo e para tratamento de água (nanocerâmicas) (DÚRAN, 2007).

Ao se falar das várias aplicações dos nanomateriais, no entanto, se faz necessário enfatizar os impactos ambientais que sua utilização pode causar, pois assim como mercúrio e elementos radioativos (urânio, por exemplo) nanopartículas são perigosos poluentes ambientais capazes de se acumular ao longo da cadeia alimentar aquática, com grave risco para a saúde animal e humana (BOURDINEAUD, 2013). Kaegi (2008) havia demonstrado que nanopartículas de dióxido de titânio usadas em pinturas exteriores comuns de fachadas de edifícios podiam atingir a superfície das águas através da chuva, assim como Ferry (2009) também demonstrou que uma única dose de nanopartículas de ouro pode ser transferida através da água para plantas, mariscos, caracóis, camarão e peixe. Então uma maior utilização de nanomateriais exige também um maior cuidado no descarte deles.

Segundo Zarbin (2007), de um modo geral, todas as propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas entre outras), manifestam-se a partir de um determinado tamanho, chamado de crítico. A **Figura 01** mostra como diferentes cores de soluções de ouro coloidal podem ser obtidas modulando os tamanhos das nanopartículas. E, frequentemente, para um mesmo material o tamanho crítico é diferente para cada uma das suas propriedades (por exemplo, o tamanho crítico para propriedades ópticas de um determinado nanomaterial pode ser 20 nm, enquanto que para as propriedades magnéticas pode ser 80 nm). Além disso, quando abaixo do tamanho crítico, as propriedades do material dependem também da forma das partículas, ou seja, nanopartículas esféricas com diâmetro de 5 nm têm propriedades diferentes daquelas encontradas para o mesmo material, mas com nanopartículas na forma de bastão com 5 nm de comprimento.

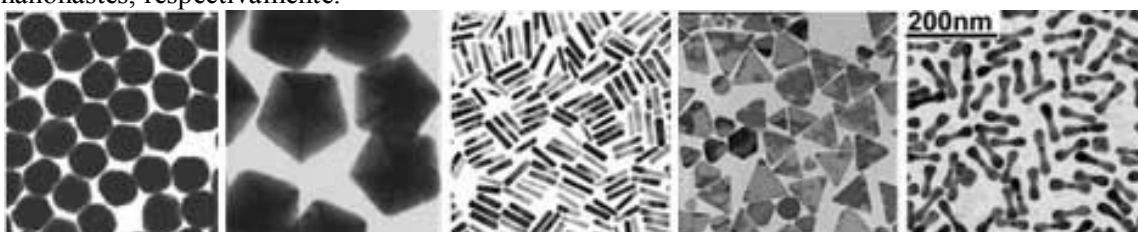
Figura 01: Cores das soluções de ouro coloidal em função do tamanho das nanopartículas.



Fonte: MIGUEL, 2012.

Através do controle do tamanho e da forma das partículas de materiais já conhecidos, podem ser preparados novos materiais, com novas propriedades e possibilidades de utilização. A alta razão superfície/volume e o fato de que os portadores de carga, em nanomateriais, ficam confinados nas dimensões reduzidas das partículas, são alguns dos fatores que contribuem para esta realidade (ZARBIN, 2007). Desta forma, todas as 5 classes de materiais (metais, polímeros, cerâmicas, semicondutores e compósitos) podem ter suas propriedades moduladas sem que se altere sua composição química e/ou estrutura tridimensional, mas única e tão somente pelo controle do tamanho e formato de suas partículas. E as inúmeras técnicas atuais de produção de nanopartículas metálicas permitem a obtenção de diversos tamanhos e formas geométricas (**Figura 02**), como triângulos e bastões, além da tradicional forma esférica (PEREIRA, 2009).

Figura 02: Micrografias de diferentes formas geométricas de nanopartículas de ouro em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Nanoesferas, nanopirâmides, nanobastões, nanoprismas e nanohastes, respectivamente.



Fonte: LUNA, 2017.

Zarbin (2007) define nanomateriais como materiais nos quais uma de suas dimensões em escala nanométrica atinge o tamanho crítico manifestando uma nova propriedade. E que só existe um nanomaterial se existir uma propriedade que se manifesta exclusivamente devido

ao tamanho reduzido, e esta propriedade é diferente do material massivo. Zarbin (2007) também explica que se temos um composto contendo partículas esféricas de 200 nm, mas todas as propriedades deste composto têm tamanhos críticos inferiores a 150 nm, este material está acima do tamanho crítico de todas as suas propriedades e não é considerado um nanomaterial, apesar de ter partículas em dimensões nanométricas.

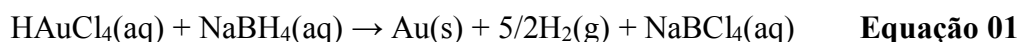
2.2 NANOBASTÕES DE OURO

Devido à menor reatividade das nanopartículas esféricas em virtude do seu menor potencial de superfície quando comparada as demais formas, elas são mais estáveis termodinamicamente e, por isso, são de mais fácil obtenção. Porém, dependendo da concentração da fonte metálica e da presença de compostos químicos, os chamados agentes direcionadores de crescimento, outras morfologias como tetraedros, cubos, prismas, cilindros, estrelas e discos, podem ser obtidas (Da SILVA et al., 2013). E dentre todas as formas possíveis de nanopartículas de ouro, os nanobastões (AuNRs) têm recebido destaque devido a suas propriedades ópticas particulares, que os lançam como potencial material para diversas aplicações em catálise, eletrônica e óptica não linear, além de aplicações biológicas e biomédicas devido à facilidade de modificação química (NIIDOME et al., 2006).

Como, em geral, as nanopartículas são termodinamicamente instáveis e têm a tendência natural de se agregarem e crescerem, o desafio do Químico de Materiais consiste em preparar nanomateriais estáveis (ou seja, que permaneçam nesta escala de tamanho sem sofrer decomposição e sem agregação e crescimento) e monodispersos, tanto com relação ao tamanho quanto com relação à forma de suas partículas, que possam ser manipulados, dispersos, depositados sobre substratos, sem perder suas características. Nesse intuito, novas rotas de síntese para os mais diferentes nanomateriais (e o preparo de diferentes nanomateriais através de adaptações em rotas já conhecidas) são descritas na literatura, juntamente com a descoberta de novas propriedades e possibilidades de aplicação (ZARBIN, 2007).

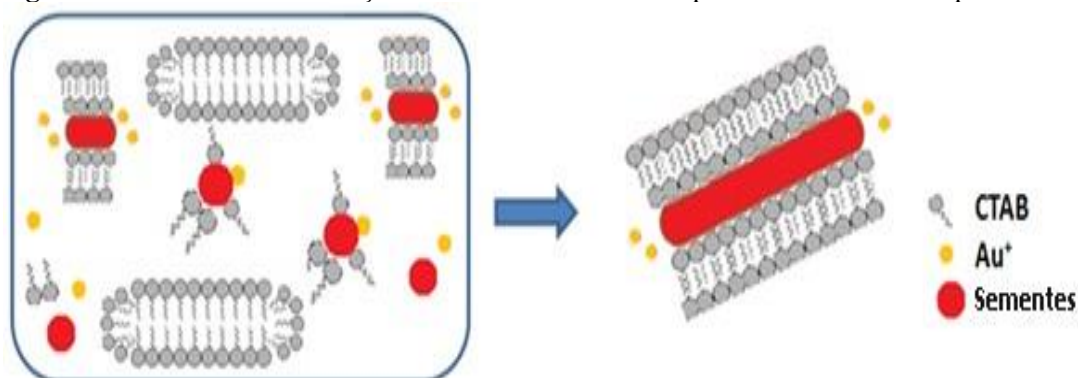
Especificamente para nanobastões, a rota sintética mais utilizada para a síntese foi descrita por Jana e Murphy (2001). Conhecido como *Seed Mediated*, esse método envolve uma solução semente e de crescimento. Na solução semente, a fonte de ouro (HAuCl_4) é reduzida por um agente redutor forte (NaBH_4), conforme a **Equação 01**, na presença de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), iniciando um processo de nucleação em que as sementes, nanopartículas de 3,5 a 4,0 nm de diâmetro, são formadas. Já na solução de

crescimento, a mesma fonte de ouro (HAuCl_4) sofre redução de um agente redutor moderado (ácido ascórbico) em presença de CTAB e nitrato de prata. Até que a adição das partículas sementes na solução de crescimento promova a formação de AuNRs. Os AuNRs podem ser obtidos com diferentes razões de comprimento e largura em função das condições de síntese (Da SILVA et al., 2013).



No método mediado por semente, a presença de um direcionador de crescimento é fundamental para a formação dos nanobastões de ouro. O CTAB é o surfactante mais utilizado nesse processo, ele é capaz de formar uma bicamada sob as facetas laterais dos nanobastões que direcionam o crescimento nas pontas (**Figura 03**). Porém a presença desta camada de revestimento de CTABr trás uma alta toxicidade aos AuNRs frente aos sistemas biológicos (WANG et al., 2008).

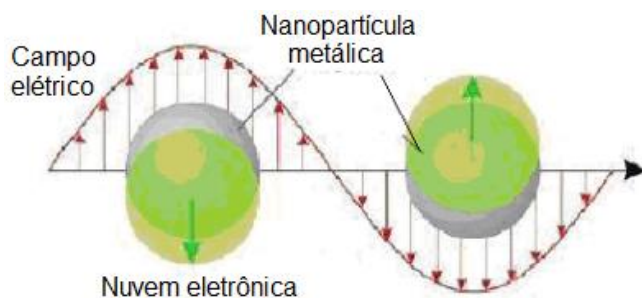
Figura 03: Dinâmica de formação de nanobastões de ouro pelo método mediado por semente.



Fonte: Da SILVA, 2014

E para a caracterização dos nanobastões de ouro são exploradas suas propriedades específicas, que envolvem coloração intensa e dicroísmo. Pois quando a luz interage com partículas muito menores que o comprimento de onda incidente é capaz de induzir a formação de um dipolo através da oscilação coletiva dos elétrons na superfície metálica (**Figura 04**). E para sair desta condição energeticamente desfavorável, surge uma força restauradora fazendo com que os elétrons oscilem ordenadamente. Sendo este fenômeno conhecido como Ressonância de Plásmom de Superfície (RPS), no qual as bandas de absorção para os nanobastões de ouro aparecem na região visível. (BONIFÁCIO, 2006; BOHREN, 1983).

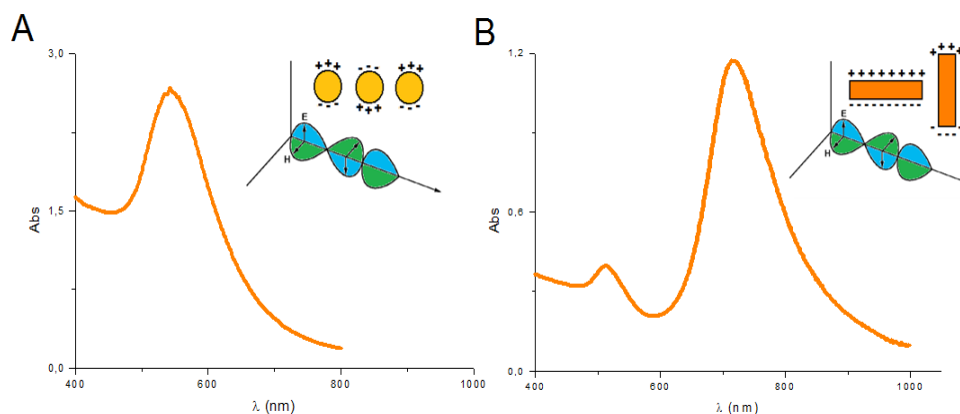
Figura 04: Interação da luz com uma nanopartícula esférica promovendo a oscilação coletiva dos elétrons.



Fonte: NUNES, 2017.

Como as bandas de absorção das nanopartículas são reflexo da oscilação coletiva dos elétrons em sua superfície (RPS), a modificação do tamanho ou da forma da partícula induz uma modificação nas bandas de plásmom. Nanopartículas de ouro anisotrópicas, como bastões, tendem a apresentar mais de uma banda de absorção, devido à oscilação dos elétrons em mais de uma direção como é mostrado na **Figura 05-B**. Diferente de uma nanopartícula de ouro esférica, que apresenta apenas uma banda de plásmom, em decorrência da formação do campo eletromagnético unidirecional em sua superfície demonstrado na **Figura 05-A** (PEREIRA, 2009).

Figura 05: Bandas correspondentes à ressonância de plásmom de superfície de nanopartículas de ouro (A) esféricas e (B) bastões.



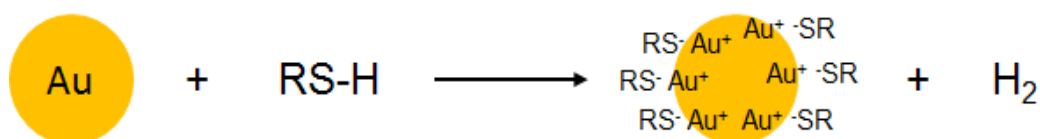
Fonte: NUNES, 2017.

É importante destacar que, em aplicações biomédicas, antes de se atingir uma fase clínica se faz necessário entender os potenciais riscos do uso de nanobastões de ouro na saúde humana e no ambiente. Como já citado, as moléculas de CTAB oriundas do processo de síntese apresentam alta toxicidade, devido a sua característica anfifílica (cabeça hidrofílica e

cauda hidrofóbica) capaz de causar lise das principais membranas biológicas (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; HEYDARIAN et al., 2013). Contudo, grande parte das moléculas de CTAB pode ser removida do sistema através de diferentes técnicas de lavagem (centrifugação e diálise) reduzindo a sua toxicidade frente a sistemas biológicos (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009). Mesmo assim, a modificação da superfície dos nanobastões através da adição de moléculas biocompatíveis (bioconjugação) é a estratégia normalmente usada para mascarar o CTAB residual preso nessa superfície (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009).

A principal metodologia utilizada para modificação da superfície de nanobastões de ouro é através de sua interação com a função orgânica tiol (R-SH) ou dissulfeto (R-SS-R), pois já é sabido que grupos tióis interagem fortemente com a superfície metálica de ouro (BARNGROVER; AIKENS, 2013). E de fato, grupos tióis oxidam os átomos de ouro da superfície das nanopartículas liberando gás hidrogênio, formando grupos sulfetos fortemente aderidos à superfície da partícula (**Figura 06**), conforme foi percebido por Matthiensen e colaboradores (2012).

Figura 06: Esquema da equação química responsável entre a interação Au-S.



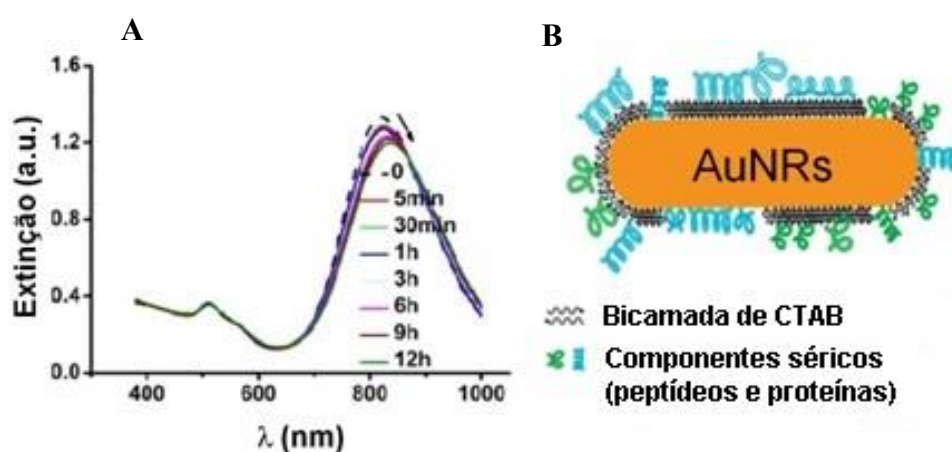
Fonte: NUNES, 2017.

Assim, constituída por 585 aminoácidos com sequências compostas de 17 pontes dissulfeto e um grupo tiol livre (Cys 34), a proteína albumina presente, por exemplo, no plasma sanguíneo, tem sido amplamente utilizada em estratégias de bioconjugação (HE; CARTER, 1992; ALKILANY et al., 2009). Ela, entre outros componentes séricos, pode se ligar à superfície das nanopartículas de ouro através de adsorção eletrostática ou interação hidrofóbica com os agentes de superfície ou através de uma ligação direta a superfície do ouro. A grande vantagem do uso de componentes séricos como agentes passivantes está no fato deles proporcionarem a internalização celular destas nanopartículas, que se dá, majoritariamente, via endocitose mediada por clatrina¹ (WANG et al. 2011).

¹ Segundo Alberts (2010) se trata de uma proteína que desempenha um importante papel no processo de formação de vesículas membranares no interior das células eucariontes, as quais são responsáveis pelo transporte

Hoje se sabe sobre a alta afinidade do resíduo de cisteína 34, presente na albumina, pelo ouro I (Au^+); que a interação de grupos tióis terminais, como o presente na cisteína, ocorre através do mecanismo elucidado por Matthiensen e colaboradores (2012); que a presença da proteína sérica albumina na superfície de nanobastões de ouro (**Figura 07A**) é capaz de alterar o plásmon de superfície dessas partículas e que durante a incubação com albumina a 10%, a banda de extinção referente ao plásmon de superfície longitudinal sofreu um deslocamento batocrômico (SHALL,1989; MATTHIESEN et al., 2012; WANG et al., 2011).

Figura 07: (A) Deslocamento na região do infravermelho próximo dos nanobastões de ouro incubados com albumina sérica bovina (BSA) e (B) esquema de interação do BSA com os nanobastões.



Fonte: WANG et al. 2011.

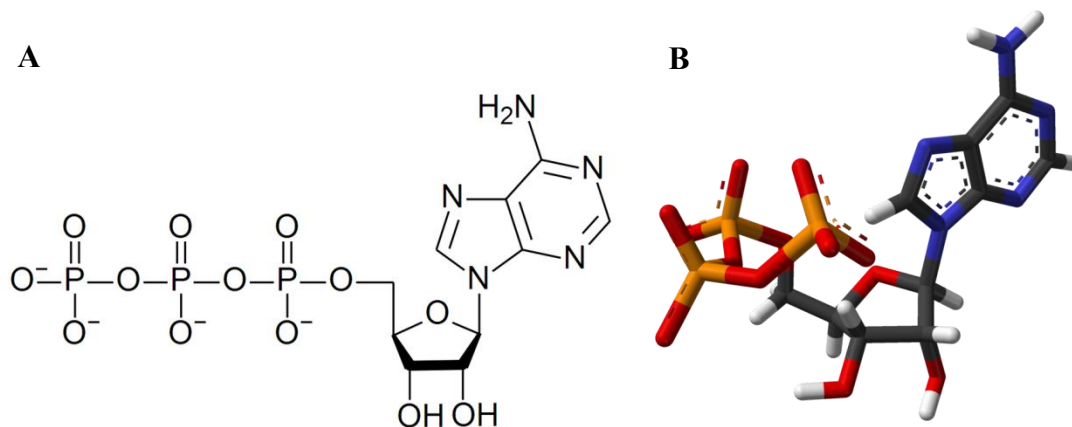
2.3 METABOLISMO E MITOCÔNDRIA

Ao conjunto de transformações químicas que ocorrem em uma célula ou em um organismo vivo dá-se o nome de metabolismo. E esse conjunto de transformações tem, além da obtenção da energia, a função de conversão de nutrientes em precursores de macromoléculas, polimerização de precursores monoméricos e síntese e degradação de biomoléculas necessárias para funções celulares específicas. O metabolismo também se encontra dividido em catabolismo e anabolismo, onde o catabolismo envolve reações de degradação de moléculas nutrientes em produtos menores (ácido láctico e CO_2) liberando

de material proveniente da membrana plasmática, entre os compartimentos endossomais e da face trans do aparato de Golgi.

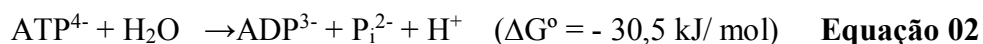
energia que pode ser conservada na forma de uma ligação de fosfato presente no ATP, trifosfato de adenosina (NELSON; COX, 2014).

Figura 08: Estrutura química (A) e modelo molecular tridimensional (B) do trifosfato de adenosina (ATP) com base em dados de difração de raios-x.



Fonte: ATKINS (2002) e KENNARD (1971).

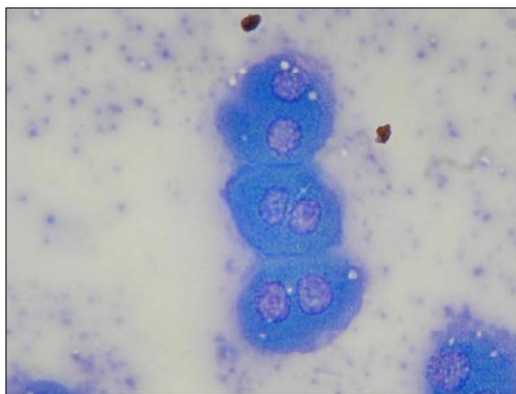
Essa liberação de energia se dá pelo fato de ocorrer uma diminuição da energia livre de Gibbs (G) desse sistema com a hidrólise do ATP (**Equação 02**), gerando uma variação de energia livre padrão (ΔG°) negativa. Essa diminuição do potencial energético ocorre devido a formação de produtos, ADP (adenosina difosfato) e P_i (fosfato inorgânico, PO_4^{3-}), mais estáveis que os reagentes, pois a entropia dos produtos é maior que a dos reagentes, além da molécula de ATP apresentar repulsão entre os átomos de oxigênio com excesso de carga negativa (**Figura 08A**) e o P_i ser estabilizado por ressonância. Essa energia liberada é utilizada para o organismo vivo realizar suas funções, assim como para transformação de moléculas simples (carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, por exemplo) em moléculas maiores e complexas como lipídeos, polissacarídeos e proteínas, processo denominado de anabolismo. Essa energia pode ser obtida também através do poder redutor das coenzimas e $FADH_2$ $NADH$, $NADPH$ produzidas na fase catabólica (NELSON; COX, 2014).



Devido à sua interposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Esse órgão recebe grandes quantidades de nutrientes que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Tem os hepatócitos (**Figura 09**) como principais células funcionais, e realiza principalmente a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento

(se necessário), conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998), dentre diversas outras funções.

Figura 09: Hepatócitos isolados por técnica de perfusão hepática utilizando collagenase, fixados e corados por hematoxilina/eosina. Aumento de 1000 vezes.



Fonte: Dos REIS, 2014.

Nesse contexto, o citocromo P450 (presente em todo o organismo, porém em maior concentração no fígado) é o mais importante sistema enzimático capaz de metabolizar xenobióticos, sendo capaz de catalisar tanto vias de oxidação quanto de redução (DANIELSON, 2002). Assim, devido a essa função, vários fatores contribuem para a toxicidade química do fígado, tornando o órgão alvo de várias classes de toxicantes e toxinas naturais. Nos hepatócitos, o processo metabólico de biotransformação destes xenobióticos hidrofóbicos pode gerar metabólitos ativos tóxicos (apesar de essas células terem mecanismos capazes de combatê-los) não acoplados às reações conjugadas protetoras, responsáveis por transformá-los em substâncias hidrofílicas, capazes de serem eliminadas mais facilmente do organismo pela excreção renal. Outros mecanismos de interação do toxicante envolvem efeitos secundários, dentre eles, depleção de moléculas celulares tais como ATP e GSH (glutathiona reduzida); produção de radicais livres; danos oxidativos principalmente para a membrana lipídica; ligação covalente de metabólitos reativos em moléculas celulares importantes e colapso do gradiente de íons regulatórios (MEYER; KULKARNI, 2001). Além disso, o fígado é o órgão de primeira passagem de qualquer fármaco que seja administrado via oral, por esse motivo é tão importante a avaliação do funcionamento hepático frente a diferentes drogas (NELSON; COX, 2014).

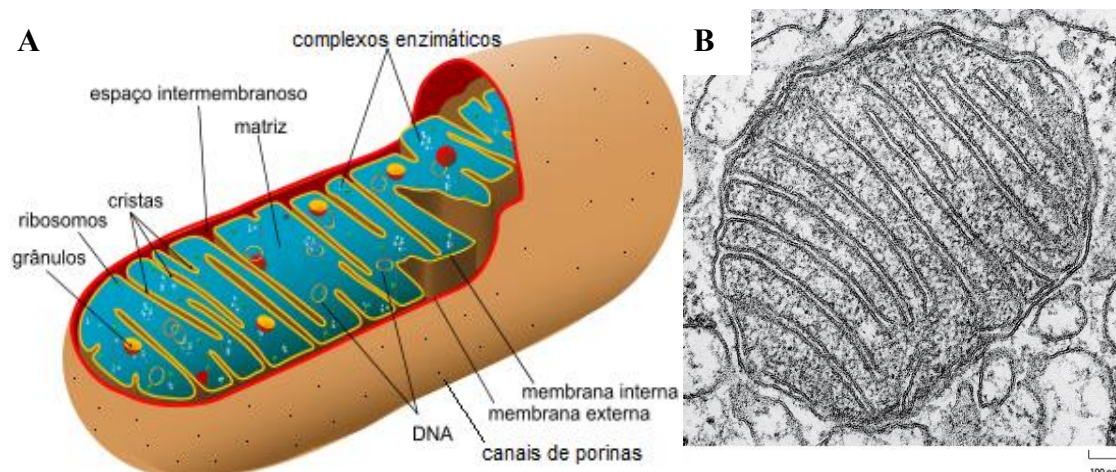
Como as mitocôndrias são as organelas envolvidas tanto no metabolismo produtor de energia química (ATP) para realização de todos os processos vitais de células aeróbicas, como na produção de radicais livres, que levam a danos oxidativos, morte celular por necrose ou apoptose, entre outras funções, elas são um alvo muito importante na análise da influência de agentes exógenos nos organismos vivos. Elas são, segundo Daum (1985), organelas intracelulares que não apresentam formas e dimensões fixas, sendo estas características dependentes do estado metabólico dos tecidos nos quais se localizam. Normalmente as existentes no parênquima hepático apresentam dimensões de 0,45 μm de diâmetro e 4,42 μm de comprimento. E o número de mitocôndrias por hepatócitos varia de 800 (SCHEFFLER, 2008) a 1312 mitocôndrias/célula, o que representa em torno de 17% do volume celular (VAN GURP et al., 2003).

Essas importantes organelas foram descritas pela primeira vez em 1857 por Rudolph Albert Von Kölliker, como compartimentos citoplasmáticos granulares presentes em músculo, denominados sarcossomos de Kölliker. Mais tarde, vários estudos com denominações diferentes para a mesma organela foram publicados, entre os quais em 1898 Benda referiu-se a esta organela como “*mitochondrion*”, do grego *mito* (filamento) e *chondrion* (partícula), que foi considerado o termo que melhor refletia a característica morfológica mais comum dessa organela e foi o mais aceito para descrevê-la do final de 1930 em diante (LIESA et al., 2009). No início do século XX, devido aos avanços na microscopia, as primeiras observações confiáveis da dinâmica mitocondrial foram possíveis, como os eventos de fusão e fissão em células vivas de galinha (LEWIS & LEWIS, 1914). Somente em 1948, Hogeboom, Schneider e Palade conseguiram isolar mitocôndrias intactas de fígado de rato através de centrifugação diferencial (LEHNINGER, 1964). Um ano depois, os bioquímicos Eugene Kennedy e Albert Lehninger demonstraram que a mitocôndria é a responsável pela síntese do ATP associada à oxidação de coenzimas ($\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2). E a partir daí vários outros trabalhos foram realizados ao longo dos anos buscando desvendar as funções dessas organelas (RONCHI, 2010; VERCESI et al., 2018).

Fruto dessas pesquisas, hoje se sabe que as mitocôndrias têm duas membranas. Uma externa permeável a moléculas pequenas ($M_r < 5000$) e a íons, que se movem livremente através de canais transmembrana, formados por uma família de proteínas chamadas porinas. E uma membrana interna impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluído prótons (H^+), porém a existência de transportadores específicos permite a passagem seletiva de algumas espécies. E como mostra a **Figura 10A**, a membrana interna delimita uma região

chamada matriz mitocondrial. É nessa região que se encontra o complexo da piruvato desidrogenase e as enzimas do ciclo de Krebs, da via de β -oxidação de ácidos graxos e todas as vias de oxidação de combustíveis, exceto a glicólise, que ocorrem no citosol (NELSON; COX, 2014).

Figura 10: Estrutura (A) e secção transversal vista em microscopia eletrônica (B) de uma mitocôndria.



Fonte: adaptado de SÓBIOLOGIA (2018) e ALBERT (2010).

A permeabilidade seletiva da membrana interna separa os intermediários e as enzimas das vias metabólicas que ocorrem no citosol daqueles envolvidos nos processos metabólicos que ocorrem na matriz. Entretanto, transportadores específicos carregam piruvato, ácidos graxos e aminoácidos ou seus α -cetoácidos derivados para dentro da matriz, para que entrem no ciclo de Krebs e sejam transformados produzindo coenzimas redutoras (NADH e FADH_2), para posterior produção de ATP a partir de P_i e ADP. Estes precursores do ATP são especificamente transportados para dentro da matriz após o ATP recém-sintetizado ser transportado para fora (NELSON; COX, 2014).

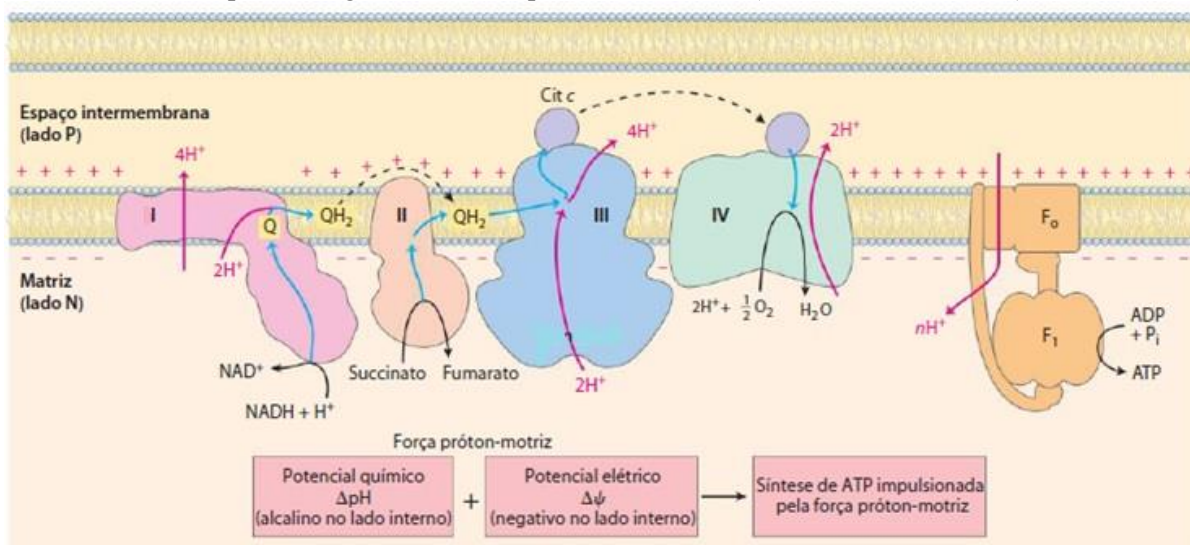
2.4 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A mitocôndria é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. A produção dessa molécula pelas mitocôndrias ocorre através do acoplamento do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa. No qual o último se trata de um processo de conversão de energia de

óxido-redução em energia química na forma de ATP e envolve a enzima ATP-sintase localizada na membrana mitocondrial interna. Já a cadeia transportadora de elétrons (ou cadeia respiratória) se trata de uma série de complexos transportadores de elétrons que convertem a energia de coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) proveniente do catabolismo de nutrientes em potencial de membrana mitocondrial, que é a força próton-motriz que promove a fosforilação oxidativa (LEITE, 2010; NICHOLLS, 2013).

De uma forma mais detalhada, o início da produção de ATP via fosforilação oxidativa se dá pela oxidação de moléculas de glicose, ácido graxo e aminoácidos para geração de acetil-CoA. Em seguida esses grupos acetil são introduzidos no ciclo de Krebs e oxidados, e a energia liberada nessa etapa é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH, FADH₂, e em uma molécula de GTP/ATP. Então na cadeia transportadora de elétrons as coenzimas reduzidas são oxidadas a NAD⁺ e FAD⁺ pela NADH-desidrogenase (complexo I) e succinato-desidrogenase (complexo II), desfazendo-se dos prótons (H⁺) e liberando elétrons (**Figura 11**). Então esse complexo enzimático transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q, ou ubiquinona, gerando a forma reduzida desta coenzima (QH₂), ubiquinol, e o complexo II (succinato-desidrogenase) transfere elétrons para a coenzima Q a partir da oxidação do succinato resultando também a reduzindo. A ubiquinona possui um caráter hidrofóbico e, dessa forma, é capaz de se difundir livremente na camada lipídica da membrana interna da mitocôndria. O complexo III transporta os elétrons da ubiquinona até o citocromo *c*. Na etapa final da cascata de oxirredução, o complexo IV completa a sequência transferindo elétrons do citocromo *c* para o O₂, formando água (NICHOLLS, 2013).

Figura 11: Modelo quimiosmótico de Mitchell mostrando o fluxo de elétrons entre os complexos enzimáticos (cadeia transportadora de elétrons), com conseqüente geração de um potencial químico e elétrico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. E a passagem de H^+ para matriz devido a essa diferença de potencial gerando ATP a partir de ADP e P_i (fosforilação oxidativa).



Fonte: NELSON; COX, 2014.

Segundo Nelson e Cox (2014) essas transferências de elétrons são realizadas por proteínas integrais com grupos prostéticos e proteínas ferro enxofre capazes de aceitar e doar um ou dois elétrons. E através delas três tipos de transferência de elétrons na cadeia respiratória são possíveis: transferência direta de elétrons, como na redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} ; transferência na forma de um átomo de hidrogênio ($H^+ + e^-$); e transferência como um íon hidreto ($:H^-$), que tem dois elétrons. Porém, às vezes, esses elétrons podem “vazar” para fora desse sistema de transferência, movendo-se do succinato para o oxigênio molecular produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical superóxido ($^{\cdot}O_2^-$). Este gera pela ação da superperóxido dismutase outra espécie reativa, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BOVERIS & CHANCE, 1973), que reage com o Fe^{2+} para produzir o radical livre hidroxil ($^{\cdot}OH$), considerado a espécie reativa mais danosa em sistemas biológicos. Estas espécies reativas de oxigênio podem provocar sérias implicações, reagindo com enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos danificando-os.

Hoje se sabe que de 0,1 até 4% do oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido a radical superóxido durante a passagem dos elétrons pelos intermediários da cadeia respiratória (NELSON; COX, 2014). Isso ocorre principalmente na passagem de elétrons do Complexo I ao QH_2 (TURRENS & BOVERIS, 1980) e do QH_2 ao Complexo III (CADENAS et al., 1977), pois envolvem o radical Q^{\cdot} que pode passar um elétron ao O_2 . Já o Complexo II apresenta um grupo prostético (heme *b*) que reduz a frequência com que esses elétrons vazam. Kowaltowski e Vercesi (1999) mostraram que o Ca^{2+} é o principal agente estimulador da

geração de EROs quando associado a um estímulo patológico. Isto pode ser explicado pela ligação do Ca^{2+} à cardiolipina, um fosfolípídeo presente na membrana mitocondrial interna em altas concentrações (de 14 a 23%), causando alterações ultraestruturais das proteínas da cadeia respiratória, facilitando a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ e conseqüentemente de $\cdot\text{OH}$ (Dos REIS, 2014).

Porém a produção de EROs na mitocôndria é um processo contínuo e fisiológico, e essa organela possui um eficiente sistema antioxidante composto pela enzima glutathiona-peroxidase (enzima tiolítica), enzima superóxido dismutase, glutathiona reduzida (GSH), NADPH, e vitaminas E e C. A função desse sistema é eliminar os radicais livres formados, bloqueando a formação de outras EROs deletérias como o radical livre hidroxil, reduzindo o estresse oxidativo causado por essas espécies (KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C, 2007).

Apesar de todos esses eventos associados à passagem de elétrons através da sequência de complexos enzimáticos da cadeia respiratória, a principal e mais importante conseqüência é o bombeamento de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (**Figura 11**), contra um gradiente de concentração. E esse acúmulo de cargas positivas gera um potencial eletroquímico transmembrânico que é o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a geração de energia química. O componente elétrico ($\Delta\Psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente -180 mV no estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila em até 1 unidade de pH. A ATP-sintase, último grande complexo enzimático da membrana mitocondrial interna, é constituída de duas regiões distintas denominadas F_1 , solúvel e localizada na matriz mitocondrial e a região F_0 , hidrofóbica e inserida na membrana mitocondrial interna. Como mostra a **Figura 11**, o fluxo de H^+ do espaço intermembranar de volta à matriz através das subunidades F_0F_1 da ATP-sintase, desta vez a favor do gradiente, permite a reação de fosforilação oxidativa, gerando ATP através de ADP e P_i (MITCHELL, 1961).

A força próton-motriz tem um papel tão importante que a equação para a síntese de ATP é, às vezes, escrita como mostra a **Equação 03**. Esta se demonstra satisfatória, pois quando mitocôndrias isoladas são suspensas em um tampão contendo ADP, P_i e um substrato oxidável como succinato pode-se observar que: o substrato é oxidado (succinato produz fumarato), oxigênio é consumido e ATP é sintetizado. O consumo de oxigênio e a síntese de ATP encontram-se acoplados e dependentes da presença de um substrato oxidável, ADP e P_i (NELSON; COX, 2014). Chance e Williams (1955) demonstraram que o consumo de

oxigênio aumentava à medida que substratos e ADP eram adicionados ao homogenato de mitocôndrias, e dividiram a fosforilação oxidativa em 5 estados (**Figura 12**): Estado 1 caracterizado pela presença de mitocôndrias; Estado 2, inicia com a adição de substratos precursores de NADH, como os intermediários do ciclo de Krebs ou succinato, para a cadeia transportadora de elétrons, caracterizado pelo início da fosforilação devido a adição de ADP; Estado 3 ou velocidade de fosforilação (V_3) é o mais importante estado, pois a adição de ADP ativa a ATP-sintase a produzir ATP aumentando a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio, quando todo o ADP adicionado é transformado em ATP, inicia-se o Estado 4 ou velocidade de repouso (V_4) que também pode ser induzido pela adição de inibidores específicos da ATP-sintase e é caracterizado pela diminuição drástica do consumo de oxigênio atingindo um platô. E, por fim, a ausência total de oxigênio leva ao Estado 5.

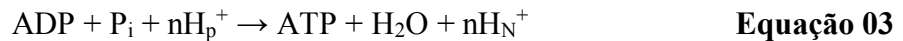
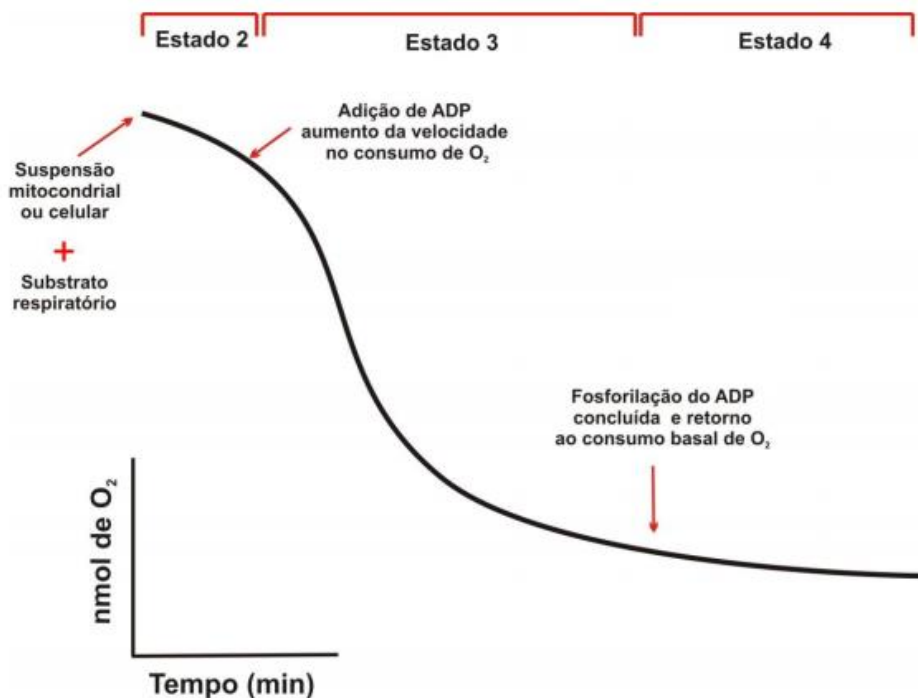


Figura 12: Representação do método de avaliação da fosforilação oxidativa através da respiração mitocondrial de acordo com a metodologia estabelecida por Chance e Willians (1955). No qual os espaços delimitados de vermelho representam os principais estados da respiração mitocondrial utilizados para avaliação da interferência de compostos sobre a fosforilação oxidativa.



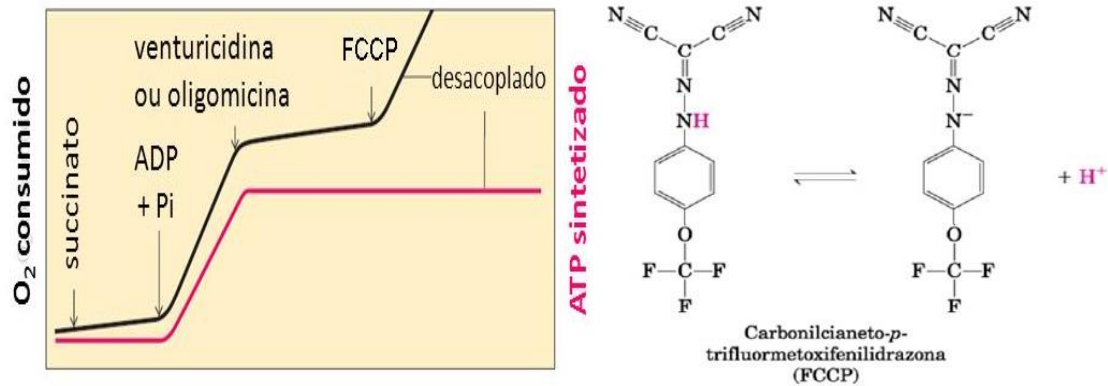
Fonte: MAIOLI, 2012.

Assim, já que a energia de oxidação de substratos permite a síntese de ATP nas mitocôndrias é esperado que inibidores da passagem de elétrons para o O₂, como cianeto, monóxido de carbono e antimicina A, bloqueiem a síntese de ATP. Fato interessante é que o inverso, que a inibição da síntese de ATP bloqueia a transferência de elétrons, também é verdadeiro. Esse acoplamento entre a oxidação e a fosforilação pode ser demonstrado usando oligomicina, antibiótico tóxico que não interage com os carregadores de elétrons, mas se liga a subunidade F_o da ATP-sintase bloqueando o fluxo de H⁺ do espaço intermembranar de volta à matriz. Isso inibe a síntese de ATP e, conseqüentemente, a transferência de elétrons através da cadeia de transportadores até o O₂ (NELSON; COX, 2014).

A explicação é que quando o fluxo de H⁺ para dentro da matriz através do canal protéico da ATP-sintase é bloqueado, não existe nenhum caminho para o retorno dessas cargas positivas para a matriz, porém o seu bombeamento para o espaço intermembranar continua com a cadeia transportadora de elétrons. Isso gera um grande gradiente de prótons que se acumula até que o custo (energia livre) para bombeá-los para fora da matriz contra este gradiente se iguale ou exceda a energia liberada para transferência de elétrons do NADH ao O₂, levando o fluxo de elétrons (cadeia transportadora de elétrons) a parar (NELSON; COX, 2014).

Porém algumas estruturas podem desacoplar a fosforilação oxidativa da cadeia respiratória, e assim catalisar a transferência de elétrons do succinato ou NADH para o O₂ sem nenhuma síntese de ATP. Um exemplo é a UCP1 (*uncoupling protein 1*), conhecida como termogenina (NICHOLLS, 1976), essa proteína de 32 kDa localizada na membrana mitocondrial interna foi primeiro identificada em tecido adiposo marrom. Em adaptação ao frio, ela é capaz de provocar um aumento da condutância a prótons na membrana mitocondrial interna, permitindo a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons, gerando calor. Mas o desacoplamento pode ser induzido também por substâncias químicas como o carbonilcianeto-*m*-clorofenilidrazona (CCCP) e o carbonilcianeto-*p*-trifluorometoxifenilidrazona (FCCP), ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas que lhes permitem difundir através das membranas mitocondriais. Eles podem liberar um próton depois de entrar na matriz na forma protonada, dissipando assim o gradiente de prótons (NICHOLLS, 1976; NELSON; COX, 2014).

Figura 13: Desacoplamento da transferência de elétrons e da síntese de ATP por ação do desacoplador químico FCCP (à esquerda) e a dissociação do seu próton (à direita).



Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2014.

2.5 MORTE CELULAR

A mitocôndria além de ter importância central na manutenção da vida através da produção de ATP, e tantas outras funções, está envolvida também na morte celular, constituindo assim um importante alvo celular para a ação tóxica de xenobióticos. Drogas prejudiciais a mitocôndria geralmente o fazem inibindo os complexos da cadeia transportadora de elétrons; inibindo ou desacoplando a fosforilação oxidativa; induzindo estresse oxidativo mitocondrial; ou inibindo a replicação do DNA. E essas ações podem induzir, como consequência, várias condições patológicas que são fatais ou podem aumentar a progressão das doenças mitocondriais existentes (SCATENA et al., 2007; CHAN et al., 2005).

Várias são as drogas e xenobióticos que fazem mal a função mitocondrial, assim como altas concentrações de metais. Isto tem sido demonstrado em mitocôndrias de fígado de rato isoladas com perfluoro-octanoato e perfluoro-octanosulfonato (5-100 μM) (STARKOV e WALLACE, 2002), para o pesticida metalocloro (0,4-5,0 $\mu mol/mg$ de proteína) (PEREIRA et al., 2009), para dioxina (20 μM) (MILDAZIENE et al., 2002), e para a acroleína (0,02-2 $\mu mol/mg$ de proteína) (SUN et al., 2006). Nesta por exemplo, à concentração de 10 a 50 μM , aumentou a formação de espécies reativas de oxigênio e causou hiperpolarização da membrana mitocondrial de células do pulmão humano (ROY et al., 2009). O cádmio também é um potente modulador da função mitocondrial, inibindo a cadeia de transporte de elétrons, estimulando o vazamento de prótons da membrana mitocondrial interna e aumentando a

produção de espécies reativas de oxigênio, o que desencadeia mutações no DNA mitocondrial (CANNINO et al., 2009). Assim como a exposição a sistemas aquáticos poluídos (com metais pesados ou poluentes orgânicos) revelaram que nas mitocôndrias de fígado de peixe *Mugil cephalus* (tainha) houve uma diminuição da atividade das enzimas da cadeia respiratória e ATP/ADP, e reduziu a atividade da superóxido dismutase mitocondrial (PADMINI et al., 2009).

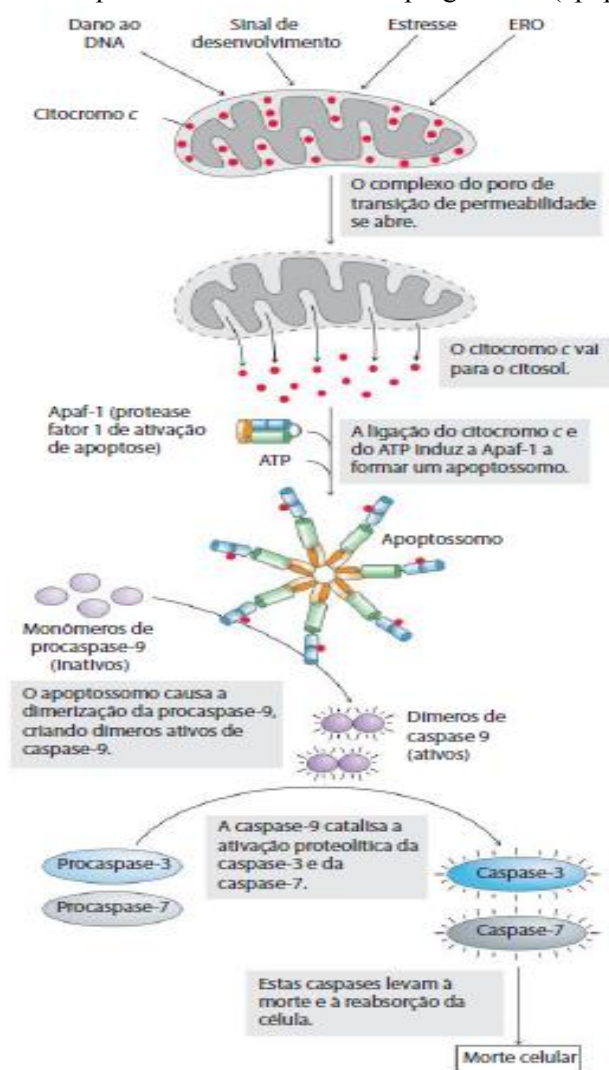
A interrupção da função mitocondrial pode resultar em morte celular por necrose ou pode sinalizar a morte celular por apoptose. A morte celular do tipo necrótica na maioria das vezes é uma forma acidental e não controlada de morte celular que pode ser induzida por injúria severa (dano físico), estresse oxidativo, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} entre outros. Esse cálcio encontra-se armazenado nos sarcolemas e quando alguma célula é danificada ele é liberado, sendo assim um sinalizador fisiológico da morte celular. E durante a necrose os eventos não seguem necessariamente uma ordem, as principais características desse evento incluem aumento do volume celular (oncoses) que leva à perda da integridade da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citosólico, disfunção das organelas intracelulares e perda da homeostase iônica intracelular (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) (RONCHI, 2010).

Já a apoptose, também chamada de morte celular programada, é um processo no qual células individuais morrem para o bem do organismo como o que ocorre na embriogênese, em processos de metamorfose, de regulação do desenvolvimento e da renovação celular. E o organismo conserva os componentes moleculares da célula (aminoácidos, nucleotídeos, entre outros). Essa via de morte celular é induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A célula apoptótica exhibe fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática, tornando-se um alvo primário de células fagocitárias. Esse mecanismo de morte pode ocorrer através de várias cascatas de sinalização, as quais podem ser divididas em: via extrínseca e via intrínseca (mitocondrial). A apoptose pela via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de membrana localizados na superfície celular que incluem o receptor de fator de necrose tumoral, o receptor CD95 (FAS) dentre outros. Enquanto que a apoptose pela via intrínseca é resultado de cascatas de eventos intracelulares nos quais a permeabilização da membrana mitocondrial externa tem papel fundamental (NELSON; COX, 2014; DOS REIS, 2014; VERCESI et al., 2018).

Assim, eventos internos como lesão do DNA, infecção viral, estresse oxidativo pelo acúmulo de EROs, choque térmico ou eventos que venham a inibir as funções mitocondriais,

forneem o sinal para a morte da célula (**Figura 14**). A conseqüência inicial é um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial externa, permitindo que o citocromo *c* escape do espaço intermembranar para o citosol. Essa transição de permeabilidade é caracterizada, *in vitro*, pelo inchamento das mitocôndrias e pode ser inibida por pH ácido, glutathiona reduzida (GSH) e ciclosporina A (CsA), redutores ditiólicos, dentre outros. Ela ocorre devido à abertura do complexo do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), formado pela agregação de várias proteínas, como por exemplo a ciclofilina D, o ANT, dentre outras como as proteínas pertencentes à família Bcl-2, no qual os membros Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose prevenindo a liberação do citocromo *c*; já os membros Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (NELSON; COX, 2014; KOWALTOVISK at al. 2000; VERCESI et al., 2006).

Figura 14: Mecanismo do processo de morte celular programada (apoptose).



Fonte: NELSON; COX, 2014.

O citocromo *c* ao ser liberado no citosol liga-se ao ATP e interage com monômeros da proteína Apaf-1 (fator ativador de proteases pró-apoptóticas) levando a formação de um apoptossomo, um complexo de alto peso molecular composto de sete moléculas de Apaf-1 e sete moléculas de citocromo *c*. Ele causa a dimerização da proteína procaspase-9, localizada no espaço intermembranar mitocondrial gerando dímeros ativos de caspase-9. As caspases pertencem à família das cisteínas proteases que têm a capacidade de reconhecer e clivar proteínas apenas no lado terminal carboxil dos resíduos de aspartato (Asp). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidos de membrana que irão sinalizar para essas células serem fagocitadas por macrófagos. Então, ao ser ativada, a caspase-9 catalisa a ativação proteolítica da caspase-3 (principal caspase executora da apoptose) e da caspase-7 que levam à morte e à absorção da célula (NELSON ; COX, 2014; ZOU et al., 1999; KRAJEWSKI et al., 1999; RAVAGNAN et al., 2002; NICHOLSON & THORNBERRY, 1997).

Além do citocromo *c* e as pró-caspases, a via intrínseca da apoptose apresenta outros fatores pró-apoptóticos do espaço intermembranar. Uma delas é a proteína Smac/DIABLO responsável por inativar um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases, além de atuar também na ativação da caspase 3 (DU et al., 2000). Outros fatores pró-apoptóticos são a endonuclease G, que promove diretamente a fragmentação do DNA nuclear (PARRISH et al., 2001), e uma proteína capaz de induzir a condensação da cromatina nuclear de modo independente da ativação de caspases, chamada fator indutor de apoptose (AIF) (SUSIN et al., 1999).

A disfunção mitocondrial atrelada a morte celular tanto por apoptose como por necrose pode ocorrer devido ao estresse oxidativo associada a altas concentrações de Ca^{2+} na matriz mitocondrial, que leva a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Tal evento é promovido pela oxidação de grupos tiólicos e caracterizada pela permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que se torna permeável à água, íons e outras moléculas com peso molecular até 1,5 kDa, levando, *in vitro*, ao inchamento das mitocôndrias com conseqüente possibilidade de ruptura da membrana externa. Então, se houver essa ruptura e a mitocôndria for incapaz de manter a produção de níveis fisiológicos de ATP intracelular, a morte celular será por necrose e ocorrerá o esgotamento total dessa molécula energética, porém se essa capacidade for mantida a mitocôndria pode liberar fatores apoptogênicos, já que essa via requer uma quantidade mínima de ATP intracelular (GREEN & REED, 1998;

HALESTRAP et al., 2002; VERCESI et al., 2006; NICOTERA et al., 1998; RONCHI, 2010; FERREIRA, 2013).

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, a influência de nanobastões de ouro na cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, bem como possíveis efeitos estruturais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar mitocôndrias de hepatócitos de ratos;
- Avaliar a influência dos nanobastões de ouro no complexo I (NADH desidrogenase) da cadeia transportadora de elétrons dessas mitocôndrias;
- Observar o efeito dos nanobastões de ouro na estrutura das mitocôndrias.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Toda a vidraria utilizada foi lavada cuidadosamente com água desionizada e etanol (70%) e os reagentes e solventes utilizados estão descritos na **Tabela 01** abaixo:

Tabela 01: Relação de reagentes e solventes utilizados no trabalho.

Reagente/Solvente	Marca
Proteína Sérica Bovina (BSA) $\geq 96\%$	Sigma - Aldrich
Sacarose	Nuclear
EGTA	Sigma - Aldrich
HEPES	Sigma - Aldrich
KCl	Dinâmica
MgCl ₂	Sigma - Aldrich
K ₂ HPO ₄	Sigma - Aldrich
Piruvato	Sigma - Aldrich
Malato	Sigma - Aldrich
α -cetoglutarato	Sigma - Aldrich
Aspartato	Sigma - Aldrich
Succinato	Sigma - Aldrich
Rotenona	Sigma - Aldrich
Oligomicina	Sigma - Aldrich
Carboxicianeto-4-(trifluorometoxi)- fenilhidrazona (FCCP)	Sigma - Aldrich
Adenosina difosfato (ADP)	Sigma - Aldrich
Álcool etílico 96%	Dinâmica
Glutaraldeído	Sigma - Aldrich
Paraformaldeído	Sigma - Aldrich
Tetraóxido de ósmio	Sigma - Aldrich
Cloreto de cálcio	Sigma - Aldrich
Ferricianeto de potássio	Sigma - Aldrich
Acetato de uranila	Sigma - Aldrich
Embed 812	Sigma - Aldrich

Fonte: AUTOR, 2018.

4.2 MÉTODOS

Com a finalidade de se alcançar os objetivos propostos, este trabalho foi dividido em quatro etapas: isolamento de mitocôndrias hepáticas, quantificação de proteínas, avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial e análise estatística. As reações de elaboração das nanoestruturas híbridas formadas pela associação de moléculas bioativas com as nanopartículas de ouro, seguidas da sua caracterização, foram realizadas pelo Grupo de Catálise e de Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (GCaR/IQB/UFAL). E esta etapa não fez parte do escopo do trabalho, com principal abordagem na avaliação da atividade das mitocôndrias isoladas executada no Laboratório de Bioenergética (LaBio) do IQB/UFAL e as imagens de microscopia eletrônica de transmissão das mitocôndrias foram obtidas no Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz.

4.2.1 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS

Devido, entre outras características, a fisiologia dos ratos ser bem semelhante à dos humanos, esse modelo animal foi escolhido como modelo experimental nesse trabalho. Então, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEUA 63/2014), ratos Wistar da linhagem *Rattus norvegicus* foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL) com média de 2 meses (peso < 200 g) e mantidos no biotério setorial da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (ESENFAR/UFAL) em gaiolas de polipropileno (49 cm x 34 cm x 16 cm), com grade aramada em aço inoxidável, sob temperatura de 22°C sem limitação de quantidade de ração e água de acordo com *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – Institute for Laboratory Anima Research*. Foram utilizados em estudos experimentais no intervalo de 60 a 80 dias de idade.

Assim, o isolamento de mitocôndrias hepáticas teve início com a eutanásia dos ratos que foram selecionados para a análise através de deslocamento cervical, tiveram os lóbulos do seu fígado coletados, foram postos em tubo Falcon com uma solução de 250 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES, 0,5 mM de EGTA e com pH 7,2 (MEIO I) e mantidos dentro de uma caixa de isopor com gelo. Em seguida, o fígado do animal foi picotado com uma tesoura (vale salientar que todos os utensílios utilizados foram lavados com água e álcool e mantidos no

gelo) e lavado 3 vezes no MEIO I para eliminar o excesso de sangue (concorrente das mitocôndrias à absorção de oxigênio).

Os fragmentos do fígado picotado foram então levados a um homogeneizador de Potter-Elvehjem, no qual o volume foi aferido e completado para 35 ml com o MEIO I e homogeneizado até que não ficassem fragmentos grandes do fígado no meio. Esse processo foi realizado também na presença de gelo para reduzir a velocidade de morte celular. Assim, utilizando a técnica de centrifugação diferencial segundo Schneider e Hogeboom (1951), o homogenato proveniente dessa etapa foi então centrifugado a 2500 g por 5 min a 4°C, teve o precipitado descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a mesma temperatura, mas com os outros parâmetros diferentes: 10.000 g por 10 min. E dessa vez a parte lipídica superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em uma solução de 250 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES, 0,3 mM de EGTA também com pH de 7,2 (MEIO II), e novamente centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado resultante foi ressuspenso em uma solução de 250 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES com pH de 7,2 (MEIO III), numa concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por mL, finalizando a etapa de isolamento mitocondrial. Essa suspensão mitocondrial foi levada a um ependorff que se manteve aberto (para possibilitar a respiração das mitocôndrias), mantida em gelo e utilizada respeitando um limite máximo de até 3 horas após o isolamento.

4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para que se mantivesse no meio de análise a mesma concentração mitocondrial em todos os ensaios, após esse isolamento se fez necessário saber o quão concentrada está a suspensão relacionando essa concentração com a quantidade de proteína do meio. E para essa finalidade foi utilizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976), no qual é empregado o corante azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250), principal constituinte do reagente de Bradford, em solução ácida. A interação deste corante, no pH de reação, com uma proteína de alta massa molecular (grupos funcionais básicos ou aromáticos) provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, causando um aumento na absorbância da luz no comprimento de onda de 595 nm. Então, segundo a lei de Beer, a unidade de absorbância é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Para essa análise foi utilizado um espectrofotômetro com feixe duplo Shimadzu (UV-3600),

equipado com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico no comprimento de onda de 595 nm. Foi utilizada uma curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA (5 a 40 µg/mL) como padrão, não admitindo $R < 0,97$.

Assim, para todos os ensaios bioquímicos foram utilizados uma concentração de 0,5 mg de proteína por mL em um meio de reação padrão de pH 7,2 à temperatura ambiente contendo: 125 mM de sacarose, 60 mM de KCl, 1 mM e MgCl₂, 2 mM de K₂HPO₄ e 10 mM de HEPES

4.2.3 EXPOSIÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS AOS NANOBASTÕES DE OURO

Tal suspensão mitocondrial e meio de reação foram usados em uma câmara de vidro de 1,0 ml, equipada com agitador magnético e termostaticada (25 °C). Onde com um eletrodo do tipo OXIGY Oxigraph (Hansatech Instruments, EUA) foi realizado os experimentos relacionados como o consumo de O₂ que é revertido em produção de ATP. Tomado como referência a concentração de oxigênio inicial do meio de reação de 225 nmol/mL (ROBINSON & COOPER, 1970), em seguida foi adicionado EGTA (200 µM), substrato para ativar a NADH desidrogenase (SI – 5mM de piruvato/malato/glutamato/ α -cetoglutarato nas proporções de 1/2/1/1), ADP (250 µM), oligomicina (1 µg/mL) e CCCP (1 µM), na sequência e com uma média de 5min de intervalo entre cada adição. Para avaliar a exposição das mitocôndrias isoladas, foi feito um traçado controle e mais 5 traçados com diferentes concentrações de nanobastões de ouro: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µM de ouro; ambos adicionados logo após o EGTA e o SI. Estas concentrações foram escolhidas devido à demonstração de Wang e colaboradores (2011) que nas concentrações de 50 e 100 µM os nanobastões causam danos seletivos em células tumorais.

4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A suspensão mitocondrial foi incubada com AuNRs e fixada em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1 M. Em seguida, a amostra fixada foi lavada três vezes no tampão cacodilato 0,1 M e ressuspensa em tetróxido

de ósmio a 1%, cloreto de cálcio 2 mM e ferricianeto de potássio 0,8% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). A amostra foi novamente lavada três vezes em tampão de cacodilato 0,1 M e contrastada com acetato de uranila a 5%. A solução final foi desidratada em acetona e embebida em Embed 812. A amostra foi armazenada por 3 dias a 60 °C, cortada em seções ultrafinas e depositada nas grades do MET. Depois disso, as grades foram contrastadas com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo, seguido de exame usando um microscópio eletrônico de transmissão.

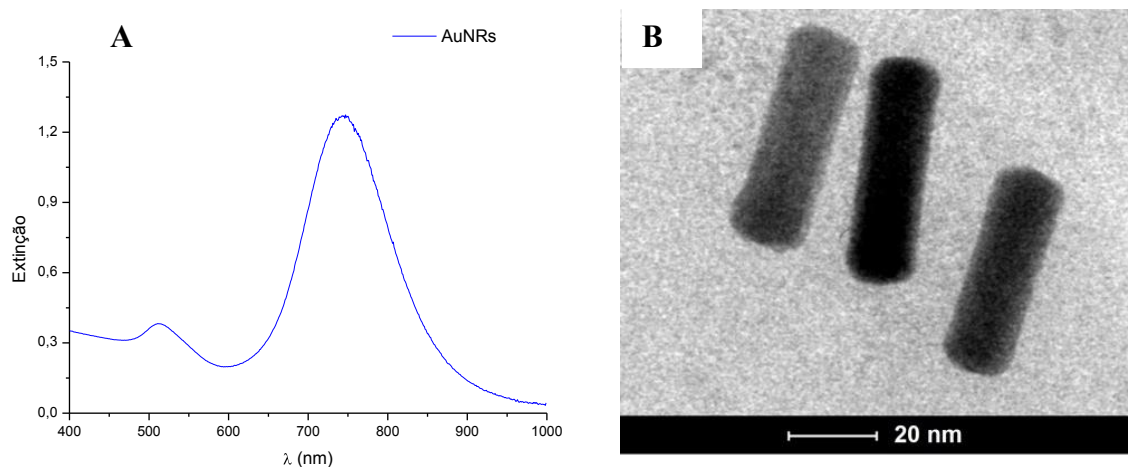
4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados encontrados foram expostos à média de no mínimo três experimentos independentes, e a análise estatística destes dados foi determinada pela análise da variância (ANOVA), seguida do post-test de Dunnett comparando grupo controle com os grupos em diferentes concentrações das nanopartículas de ouro. Resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O *software* utilizado para os estudos estatísticos foi o GraphPad Prism versão 5.0 pra Windows e os espectros foram todos plotados no Origin versão 6.0 também para Windows.

5.0 RESULTADOS E DICUSSÃO

Os nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método mediado por semente (JANA et al., 2001) no grupo Grupo de Catálise e de Reatividade Química (GCarR). Com a finalidade de confirmar que a morfologia objetivada foi alcançada o GCarR realizou a caracterização por espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A presença de duas bandas de absorção (**Figura 15A**) é característica de nanopartículas anisotrópicas ou elipsóides como já afirmado por Pereira (2009) e El-Sayed (2009), e a micrografia revelou a sua forma de bastão (**Figura 15B**).

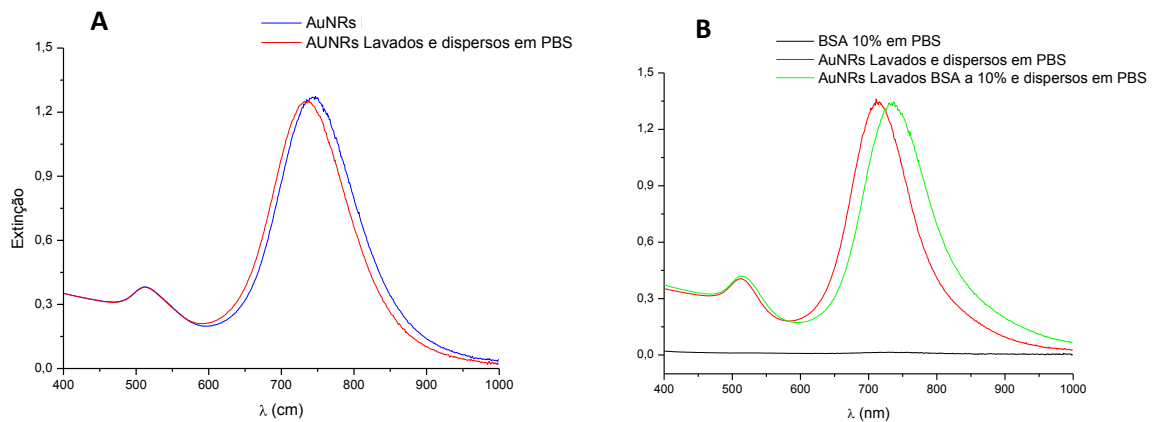
Figura 15: (A) Espectro de UV-Vis dos nanobastões de ouro sintetizados e (B) sua respectiva microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: NUNES, 2017

Em virtude da presença de CTAB na superfície dos AuNRs conferir a eles um alto grau de toxicidade, com a finalidade de reduzir este efeito os AuNRs foram lavados com água deionizada para remoção do CTAB residual, e em seguida foram incubados em solução tampão fosfato salino (PBS) e BSA a 10% e o pH foi corrigido para 7,4. O sistema foi caracterizado por UV-Vis e os espectros dos AuNRs antes e depois da lavagem com água e redispersos em PBS revelaram que não houve significativa alteração das bandas de absorção (**Figura 16A**), mostrando relativa estabilidade no tampão PBS não havendo modificações espectrais relevantes. Já o espectro das AuNRs na presença de BSA, importante no processo de internalização celular das nanopartículas, apresentou um deslocamento batocrômico de 20 nm (**Figura 16B**), sem efeitos significativos na intensidade das bandas, o que sugere a ancoragem do BSA na superfície das nanopartículas.

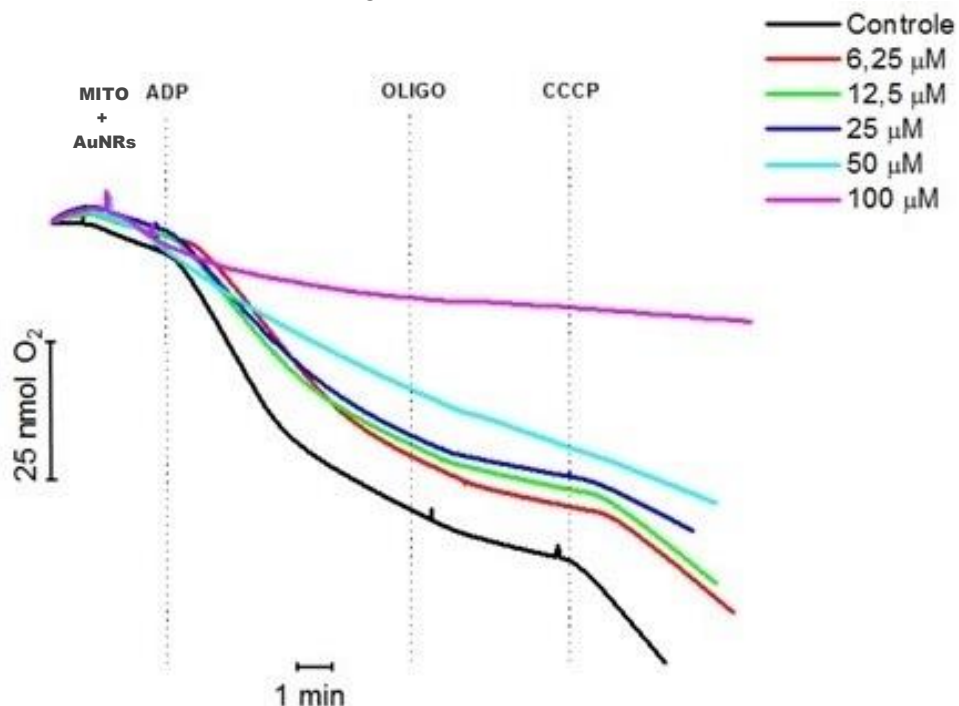
Figura 16: Espectros de UV-Vis de nanobastões de ouro. (A) Comparação antes e após a lavagem e (B) comparação com os AuNRs tratados com BSA.



Fonte: NUNES, 2017

Esses resultados levaram a confirmar que os nanobastões de ouro foram sintetizados e partiu-se para a etapa de análise da atividade mitocondrial. Assim, após o isolamento das mitocôndrias com posterior quantificação de proteínas, o consumo de oxigênio foi mensurado com o auxílio do oxígrafo e chegou-se ao resultado apresentado na **Figura 17** abaixo.

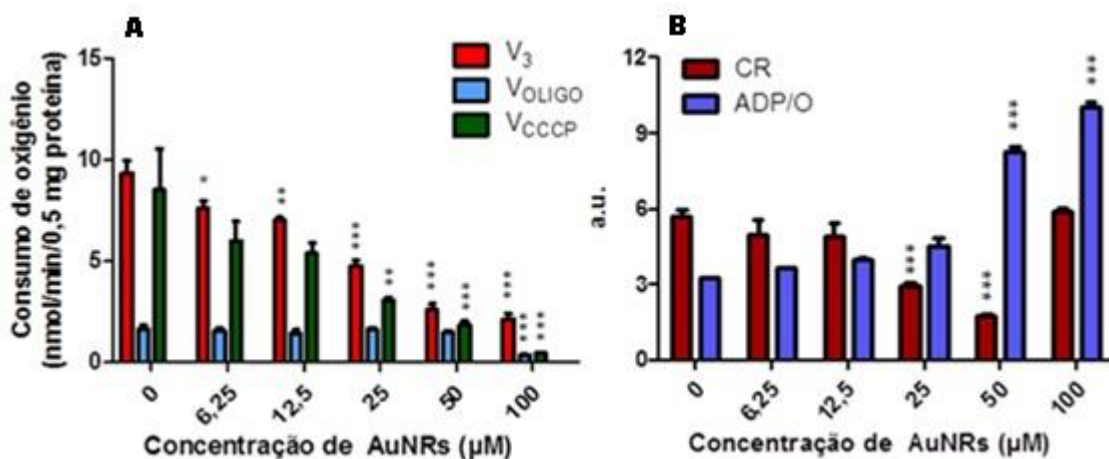
Figura 17: A presença dos AuNRs provocou uma diminuição no oxigênio consumido de forma dose-dependente. A figura é representativa de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. $p < 0,05$. MITO = mitocôndria, OLIGO = oligomicina.



Fonte: Autor, 2018

Observa-se que a adição da mitocôndria dá início ao consumo de oxigênio e que com a adição de ADP a curva de consumo de oxigênio sofreu um declive acentuado (V_3). Em seguida observou-se a diminuição gradual desse declive devido à fosforilação desse ADP adicionado à ATP (V_4), para induzir esse platô quimicamente foi adicionado o inibidor da ATP-sintase a oligomicina, e conseqüentemente o fluxo de H^+ é inibido, diminuindo consideravelmente o consumo de oxigênio (V_{OLIGO}). Para a retomada desse consumo de oxigênio, independentemente da síntese de ATP, foi adicionado o desacoplador químico CCCP (V_{CCCP}). Com a finalidade de melhor visualização e comparação de alguns dos resultados foram plotados os gráficos de barra demonstrados na **Figura 18** abaixo.

Figura 18: Consumo de oxigênio nos estados III, IV e V_{CCCP} (A), Controle Respiratório e Razão ADP/O (B). As barras representam a média \pm S.D. ($n = 3$). $p < 0,05$. OLIGO = oligomicina.



Fonte: Autor, 2018.

Comparando-se inicialmente os traçados é possível verificar um decréscimo no consumo de oxigênio em função do aumento da concentração de nanobastões, em que a variação da quantidade de oxigênio no meio, no início e no final de cada traçado diminui com o aumento da concentração de nanobastões de ouro no meio. Investigando a influência em cada estado respiratório observou-se que o efeito dos nanobastões de ouro sobre V_3 foi extremamente significativo e o consumo de oxigênio neste estado diminuiu à medida que a concentração dessas nanopartículas no meio aumentou como mostra o gráfico da **Figura 18A**. É possível observar também que os AuNRs diminuíram a velocidade de desacoplamento (V_{CCCP}). A diminuição concomitante de ambos estados sugere que os AuNRs podem estar causando uma disfunção no funcionamento dos complexos presentes na cadeia transportadora

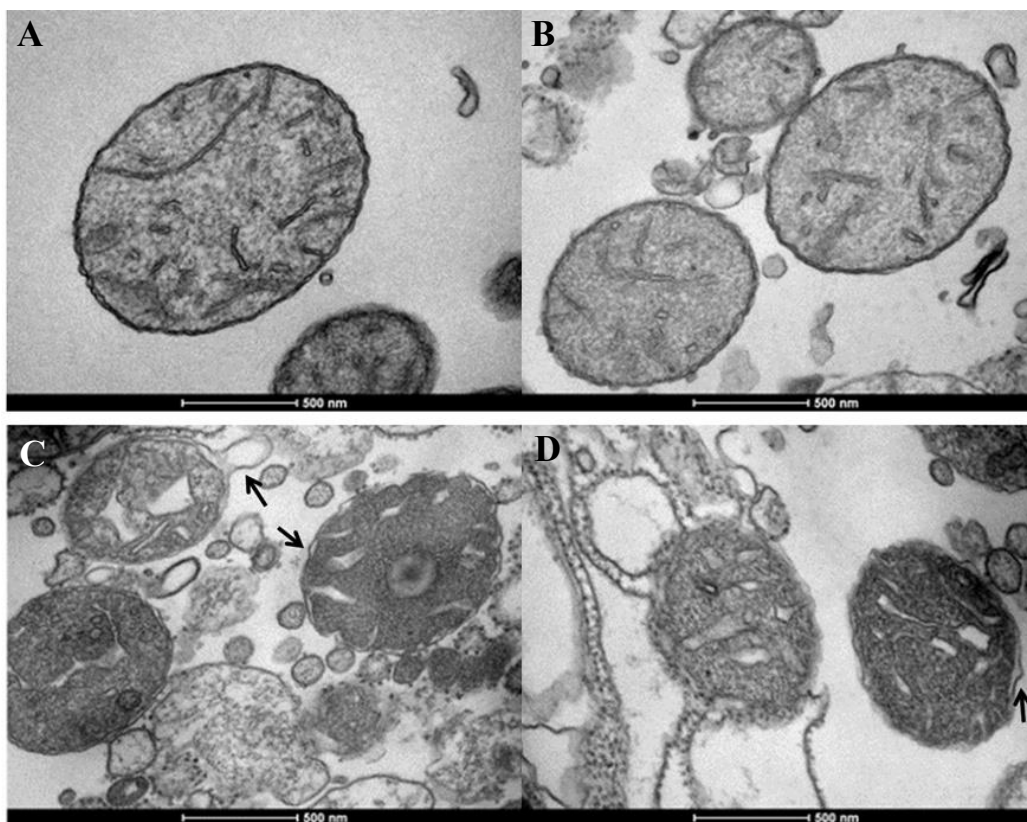
de elétrons. Ainda neste gráfico observou-se que a velocidade de repouso V_{OLIGO} não sofreu variação significativa em nmols de oxigênio consumido, quando na presença de AuNRs.

Resultado semelhante havia sido encontrado por Bourdineaud, Rossignol e Brèthes (2013) ao investigarem o efeito de nanopartículas esféricas de ouro como poluentes do microambiente aquático do zebrafish na mitocôndria isolada do músculo destes peixes. Foram avaliados dois diâmetros de nanopartículas: de 50 nm, que foram capazes de causar diminuição em V_3 e V_{CCCP} , e 12 nm, que não causaram o mesmo efeito. E concluíram que, além da concentração, o tamanho da partícula influencia diretamente a sua toxicidade.

Já a **Figura 18B** envolve a análise de dois parâmetros bioenergéticos, um deles é a viabilidade mitocondrial através do controle respiratório (CR). Este é calculado a partir da razão entre a velocidade de fosforilação e a velocidade de repouso (V_3/V_4) e, para o complexo I, apresenta valor ideal próximo a 6 (TAHARA, 2009). Outro parâmetro bioenergético importante é a razão entre a concentração de ADP, adicionada no estado 3, e a concentração de oxigênio consumida neste mesmo estado e, também para o complexo I, apresenta valor satisfatório quando próximo de 3 (ESTABROOK, 1967). Observou-se então na **Figura 18B** que a medida que a concentração de AuNRs aumenta os valores de V_3 diminuem e o V_4 permanece constante levando a um CR cada vez menor. É importante observar que embora os valores da maior concentração de AuNRs (100 μ M) apresente um CR semelhante ao controle isso só acontece porque o traçado perde completamente o seu perfil de consumo de oxigênio, apresentando tanto o V_3 quanto o V_4 e V_{OLIGO} baixos. Já a ADP/O tende a aumentar devido a diminuição do consumo de oxigênio nas mitocôndrias tratadas com os nanobastões de ouro. Segundo Matthiesen e colaboradores (2013), estas nanoestruturas provavelmente são capazes de interagir com os grupamentos tiólicos presentes nos complexos enzimáticos.

Para melhor ilustrar o efeito danoso dessa maior concentração de AuNRs (100 μ M) na morfologia de mitocôndrias isoladas foi feita a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O resultado demonstrou que as mitocôndrias tratadas com o AuNRs apresentaram um padrão desorganizado de cristas (**Figura 19C e 19D**) comparado ao controle (**Figura 19A e 19B**), além de um deslocamento intermembranar nas mitocôndrias tratadas (**Figura 19C e 19D** – setas pretas). A presença de AuNRs não foi observada em nenhuma imagem, provavelmente devido as sucessivas lavagens (10 lavagens) realizadas para promover a fixação e o contraste na preparação da amostra.

Figura 19: Influência de AuNRs na morfologia de mitocôndrias isoladas por imagens de microscopia de transmissão. Imagens representativas de mitocôndrias controle (A e B) e com tratamento (C e D) de nanobastões de ouro a 100 μ M. Escala de 500 nm.



Fonte: Autor, 2018.

6.0 CONCLUSÃO

No presente trabalho, mitocôndrias isoladas de hepatócitos de ratos foram expostas a várias concentrações de nanopartículas de ouro com formato de bastões recobertas com BSA, objetivando avaliar a toxicidade dessas estruturas. E concluiu-se que na presença destas a velocidade de consumo de oxigênio mitocondrial, essencial para a realização das funções vitais das células, diminuía de forma dose-dependente. Essa ação deletéria, quando em níveis acima do normal, induz a morte celular. E assim como Matthiesen e colaboradores (2013), supõe-se que os nanobastões de ouro são capazes de interagir com os grupamentos tiólicos presentes nos complexos enzimáticos.

Apesar de tais resultados, ainda se faz necessário uma análise *in vivo* para saber o grau de internalização dessas nanopartículas nas células. Além de que o mecanismo no qual os AuNRs afetam as mitocôndrias ainda não foi claramente elucidado fazendo-se necessárias outras análises, sugestivamente: determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial, medida de inchamento mitocondrial e estimativa da produção de espécies reativas de oxigênio. Contudo, a elucidação da forma de ação dos nanobastões de ouro apresentada nesse trabalho foi o primeiro passo no entendimento do seu mecanismo de ação a nível celular.

REFERÊNCIAS

ALBERT, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2010. 818p.

ALKILANY, Alaaldin M. et al. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. **small**, v. 5, n. 6, p. 701-708, 2009.

ASKELAND, D. R.; **The Science and Engineering of Materials**, 3rd ed., PWS Publishing Company: Boston, 1994.

ASTRONOO. **Tamanho dos Átomos**. Disponível em:
<<http://www.astronoo.com/pt/artigos/tamanho-dos-atomos.html>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

BARNGROVER, B.M.; AIKENS, C.M. Oxidation of gold clusters by thiols. **The Journal of Physical Chemistry**, EUA, v. 117, n. 25, p. 5377-5384, 2013.

BASF. **Nanoeletrônica - O princípio da miniaturização**. Disponível em:
<<https://www.basf.com/pt/we-create-chemistry/creating-chemistry-magazine/quality-of-life/nanoelectronics.html>>. Acesso em: 22 de nov. 2018.

BOHREN, C.F.; HUFFMAN, D.R. **Absorption and scattering of light by small particles**. New York: Wiley-Interscience, 1983, 529 p.

BONIFÁCIO, L.S. **Processos de agregação e fusão de nanopartículas de ouro**: uma abordagem química. Mestrado (Mestrado em química) – USP, São Paulo, 2006.

BOURDINEAUD, J; ROSSIGNOL, R.; BRETHERS, D. Zebrafish: a model animal for analyzing the impact of environmental pollutants on muscle and brain mitochondrial bioenergetics. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 1, p. 16-22, 2013.

BOVERIS, Alberto; CHANCE, Britton. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C. I.; STOPPANI, A. O. M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 180: 248-257, 1977.

CANNINO, G.; FERRUGGIA, E.; LUPARELLO, C.; RINALDI, A. M. Cadmium and mitochondria. **Mitochondrion**, 2009;9(6):377-84.

CARLES, Mauricio; HERMOSILLA, Lígia. O futuro da medicina: nanomedicina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2008.

CHAN, K.; TRUONG, D.; SHANGARI, N.; O'BRIEN, P. J. Drug-induced mitochondrial toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, 2005;1(4):655-69.

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

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

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

DANIELSON, P.B. The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Curr. Drug Met.**, v. 3, p. 561-597, 2002.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **BiochimBiophys Acta**, v. 822, n. 1, p. 1- 42, 1985.

Dos REIS, Felipe Henrique Zuccolotto. **Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato**. Ribeirão Preto, 2014.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, 2000; 102(1): 33-42.

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

FERREIRA, V. V. A. N., 1986 – Inibição da transição de permeabilidade mitocondrial por cPTIO, um sequestrador de óxido nítrico/ Vinícius Vercesi Almada Nogueira Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

FERRY, J. L.; GRAIG, P.; HEXEL, C.; SISCO P.; FREY, R.; PENNINGTON, P. L., et al. Transfer of gold nanoparticles from water column to the estuarine food web. **Nature Nanotechnology** 2009; 4(7): 441-4.

FQ.PT. **Massa molecular relativa**. Disponível em: <<http://www.fq.pt/substancias/massa-molecular-relativa>>. Acesso em: 14 de ago. 2018.

FEYNMAN, R. Há mais espaços lá embaixo. Caltech's Engineering and Science, 1960.

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

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, supl. 2, p. 511-532, 1998.

HALESTRAP, A. P.; KERR, P. M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K. Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **BiochimBiophys Acta** 1998; 1366(1-2): 79-94.

HE, X.M.; CARTER, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, EUA, v. 358, n. 209-215, 1992.

HEYDARIAN, A.; KHARRAT, R.; HEYDARIAN, S.; HASHEMI, A. Impact of nanoparticles on static performance of surfactant foams. **Journal of American Science**, Irã, v. 9, n. 6, p. 444-449, 2013.

HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M.A. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. **Advanced Materials**, Georgia, v. 21, p. 4880-4910, 2009.

IDGNOW. **Há 60 anos, invenção do transistor revolucionou a eletrônica**. Disponível em: <<http://idgnow.com.br/mercado/2007/12/13/idgnoticia.2007-12-13.0461382793/>>. Acesso em: 22 de nov. 2018.

JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C.J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 19, p. 4065-4067, 2001.

KAEGI, R.; ULRICH, A.; SINNET, B.; VONBANK, R.; WICHSER, A.; ZULEEG, S., et al. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior fac, ades into the aquatic environment. **Environmental Pollution**, 2008;156(2):233-9.

KENNARD, O. et al. The crystal and molecular structure of adenosine triphosphate. In: **Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**. The Royal Society, 1971. p. 401-436.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell death and differentiation**, v. 7, n. 10, p. 903, 2000.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 26: 463-71, 1999.

KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; ELLERBY, L. M.; WELSH, K.; XIE, Z.; DEVERAUX, Q. L.; SALVESEN, G. S.; BREDESEN, D. E.; ROSENTHAL, R. E.; FISKUM, G.; REED, J. C. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 5752-7.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran: Patologia, bases patológicas das doenças**. 7^a ed. Saunders, 2007.

LEHNINGER, A. L. **The mitochondrion: molecular basis of structure and function**. WA Benjamin, Inc. 1964; New York, USA.

LEITE, A. C. **Inibidores de óxido nítrico sintetase modificam a suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial em roedores normo- e hipercolesterolêmicos**. 111 pág. Tese (Doutorado). Campinas, SP, 2010.

LEWIS, M. R.; LEWIS, W. H. Mitochondria in tissue culture. **Science** 1914; 39: 330-3.

LIESA, M.; PALACÍN, M., ZORZANO, A. **Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease** **Physiol Rev**. 2009; 89(3): 799-845.

LUNA, M. **Nanopartícula para la medicina del futuro**. Disponível em: <http://www.elmundo.es/elmundo/2012/03/26/nanotecnologia/1332760914.html>. Acesso em: 22 de out. 2017.

MAIOLI, M. A. Papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina em hepatócitos isolados de rato / Marcos Antonio Maioli. – Araçatuba : [s.n.], 2012.

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

MEYER, S.A; KULKARNI, A.P. Hepatotoxicity. In: HODGSON, E.; SMART, R.C. (eds.) **Introduction to biochemical toxicology**, 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p.487-507.

MIGUEL, C. S. C. (setembro de 2012). Síntese e Caracterização de Nanopartículas FeOx/Au/Ag em Multicamada Núcleo-concha. Funchal, Portugal: Centro de Química da Madeira.

MILDAZIENE, V.; NAUCIENE, Z.; BANIENE, R.; GRIGIENE J. Multiple effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **Toxicological Sciences**, 2002;65(2):220–7.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, 191: 144-148, 1961.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1274 p.

NICHOLLS, D.G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Lett.**;61:103-110, 1976.

NICHOLLS, David G. **Bioenergetics**. Academic Press, 2013.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**. 1997; 22:299-306.

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

NUNES, A. M. **Preparação e aplicação de nanoestruturas híbridas, à base de nanobastões de ouro, como agentes anticancerígenos com potencial ação nabioenergética mitocondrial**. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

PADMINI, E.; VIJAYA GEETHA, B.; USHA RANI, M.; Pollution induced nitrate stress and heatshock protein 70 overexpression in fish liver mitochondria. **Science of the Total Environment**, 2009;407(4):1307–17.

PALMA, I. D. F. Fipronil na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Ivo Dias Ferreira Palma. -- Araçatuba: [s.n], 2014.

PARRISH, J.; LI, L.; KLOTZ, K.; LEDWICH, Wang X.; XUE, D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. **Nature** 2001; 412: 90-4.

PEREIRA, S. P.; FERNANDES, M. A.; MARTINS, J. D.; SANTOS, M.S.; MORENO, A. J.; VICENTE, J. A. et al. Toxicity assessment of the herbicide metolachlor comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems. **Toxicology In Vitro** 2009; 23(8): 1585–90.

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

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J Cell Physiol.** 2002; 192(2): 131-7.

RONCHI, J. A. Transição de permeabilidade mitocondrial em mitoplastos de fígado de rato / Juliana Aparecida Ronchi. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

ROY, J.; PALLEPATI, P.; BETTAIEB, A.; TANEL, A.; AVERILL-BATES, D. A. Acrolein induces a cellular stress response and triggers mitochondrial apoptosis in A549 cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2009; 181(2): 154–67.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; BOTTA, G.; MARTORANA, G. E.; GIARDINA, B. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. **American Journal Physiology and Cell Physiology**, 2007; 239(1): C12–21.

SCHEFFLER, I.E. **Mitochondria**. 2. ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2008. 378 p.

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

SÓBIOLOGIA. **Mitocôndrias**. Disponível em: <<https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito27.php>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

STARKOV, A. A.; WALLACE, K.B. Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction. **Toxicological Science**, 2002; 66(2): 244–52.

SUN, L.; LUO, C.; LONG, J.; WEI, D.; LIU, J. Acrolein is a mitochondrial toxin: effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. **Mitochondrion**, 2006; 6(3): 136–42.

SUSIN S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J. E.; JACOTOT, P.; COSTANTINI, M.; LOEFFLER, N.; LAROCLETTE, D. R.; GOODLETT, R.; AEBERSOLD, D. P.; SIDEROVSKI, J. M.; PENNINGER & KROEMER, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, 1999; 397: 441-6.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, Felipe DT; KOWALTOWSKI, Alicia J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1283-1297, 2009.

TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J.** 191: 421-427, 1980.

VAN GURP, M. et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochem.Biophys.Res. Commun.**, v. 304, n. 3, p. 487-497, 2003.

VERCESI, A. E. et al. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.

VERCESI, A.; KOWALTOWSKI, A.J.; OLIVEIRA, H.C.; CASTILHO, R.F. Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front. Biosci.** Tampa, v. 11, p. 2554-2564, 2006.

WANG, L. et al. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. **Nano Letters**, Japão, v. 11, n. 2, p. 772-780, 2011.

WANG, S.; LU, W.; TOVMACHENKO, OLEG, RAI, U.S.; YU, H.; RAY, P.C. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, Jackson, EUA, v 463, p. 145-149, 2008.

ZARBIN, A.J.G. Química de (Nano)materiais. **Química Nova**, Curitiba, PR, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZOU, H.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J Biol Chem.** 1999; 274: 11549-56.