



Mariana Gisbert Jardim dos Santos

**Caracterização de nanopartículas de ouro sintetizadas por
ablação a laser pulsado em água, e análise de
citotoxicidade e modulação da produção de espécies
reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos RAW
264.7**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Física pelo Programa
de Pós-graduação em Física, do Departamento de
Física da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Dr. Tommaso Del Rosso

Rio de Janeiro,
outubro de 2022



Mariana Gisbert Jardim dos Santos

**Caracterização de nanopartículas de ouro
sintetizadas por ablação a laser pulsado em
água, e análise de citotoxicidade e
modulação da produção de espécies
reativas de oxigênio e nitrogênio em
macrófagos RAW 264.7**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
graduação em Física da PUC-Rio. Aprovada pela
Comissão Examinadora abaixo:

Prof. Dr. Tommaso Del Rosso

Orientador

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho

INMETRO

Dr. Rafael dos Santos Carvalho

Departamento de Física – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 07 de outubro de 2022

Todos os direitos reservados. A reprodução, total ou parcial, do trabalho é proibida sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Mariana Gisbert Jardim dos Santos

Graduada em Bacharel em Física pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2018) e Graduada em Licenciatura em Física pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2019).

Ficha Catalográfica

Santos, Mariana Gisbert Jardim dos

Caracterização de nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser pulsado em água, e análise de citotoxicidade e modulação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos RAW 264.7 / Mariana Gisbert Jardim dos Santos; orientador: Tommaso Del Rosso. – 2022.

202 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, 2022.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. Ablação por laser pulsado. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Citotoxicidade. 5. Espécies reativas de oxigênio (EROs). 6. Espécies reativas de nitrogênio (ERNs). I. Del Rosso, Tommaso. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

Dedico esta dissertação a minha avó Judite Soares.
Dedico também este trabalho a memória do meu querido tio Nilton Soares.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida e me conceder o privilégio de contribuir para a comunidade científica.

Aos meus pais, Marcus Jardim e Denize Gisbert, por sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

Aos meus queridos irmãos Joana e Pedro por acreditar no meu sonho e sempre me motivar a seguir em frente. Amo Vocês!

A minha amada avó Judite Soares por todo amor, apoio, incentivo nos momentos difíceis, de desânimo e de cansaço.

Aos meus padrinhos Solange Lemos e Fernando Lemos por sempre estarem presentes com palavras de encorajamento e força.

Agradeço aos amigos que colaboraram na pesquisa Guilherme Concas e Tahir, por serem sempre solícitos e generosos comigo. Agradeço imensamente por todo tempo destinado a me ajudar.

Aos amigos que realizei no INMETRO, Paula Dias, Natália Yoshihara, Nathália Ramos, Wanderson de Souza e Claudio Lopes por toda disponibilidade em ajudar e por proporcionar um local de trabalho impecável.

Agradeço em especial a Michelle Lopes e a Beatriz Kopke por me apresentarem ao incrível mundo das células e pelos ensinamentos científicos. Serei eternamente grata por toda ajuda no decurso deste trabalho.

Agradeço a Liz Silveira, Debora Rosa, Natália Lima, Juliana Cilento, Thainá Zuquim, Leandro Cibis, Thaís Serra, Dennys Menezes, Luís Gonçalves e Wanessa Affonso pela amizade e motivação durante o meu mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Tommaso Del Rosso pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança, paciência, dedicação e pelo entusiasmo contagiante. MUITÍSSIMO obrigada por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável.

Agradeço ao Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho por ter disponibilizado o laboratório para a realização dos experimentos e análises biológicas. Sua contribuição foi essencial para a concretização de todas as pesquisas desenvolvidas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Cuin, por sua preciosa ajuda e valiosa colaboração.

A Prof.^a. Dr.^a Anna Laurenzana e a Prof.^a. Dr.^a Francesca, pela disponibilidade, atenção e ajuda.

Aos professores do programa de pós-graduação em Física, por todo conhecimento transmitido durante o curso de Mestrado, e em especial ao Prof. Dr. Jefferson Ferraz por estar sempre pronto em ajudar.

Ao Prof. Dr. Alexandre Camara que me incentivou a percorrer o caminho da pesquisa científica.

A todos os funcionários do departamento da secretária da pós-graduação em física por toda ajuda e atenção.

Também quero agradecer à Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, fundamental no meu processo de formação profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a minha formação acadêmica.

Resumo

Gisbert, M. Tommaso Del Rosso. **Caracterização de nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser pulsado em água, e análise de citotoxicidade e modulação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos RAW 264.7**. Rio de Janeiro, 2022. 202p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A pandemia da COVID-19 instaurou inúmeras pesquisas sobre a doença, a qual foi atribuída à tempestade de citocinas. Embora, as vacinas sejam eficazes para combater a disseminação da COVID-19 e, recentemente, tenha sido aprovado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o fármaco antiviral Paxlovid™, no tratamento da COVID-19, estudos sobre formas de tratamento ainda são necessários. Dentre as novas estratégias terapêuticas, a utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) tem se destacado devido o potencial efeito anti-inflamatório. O objetivo deste trabalho foi estudar as eventuais propriedades anti-inflamatórias das AuNPs, sintetizadas por ablação a laser pulsado (PLA) em água, em macrófagos RAW 264.7. Ademais, o presente trabalho visou investigar a possível ligação entre o efeito imunomodulador das nanopartículas e os produtos secundários obtidos através da reação de redução da CO₂ (CO₂RR) ativada por PLA em água. Nesse sentido, foram analisados a proliferação, a citotoxicidade, os níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) e das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) nos macrófagos RAW 264.7 submetidas ao tratamento com as AuNPs e expostas ao lipopolissacarídeo (LPS), o qual foi utilizado como agente precursor do processo inflamatório. Em conclusão, os resultados apontaram que AuNPs na concentração de 10µg/mL não tiveram caráter citotóxico e diminuíram as EROs e ERNs. As AuNPs demonstraram promissora atividade anti-inflamatórias com reduzidos valores de citotoxicidade, o que aponta para uma futura aplicação clínica.

Palavras-chave

Ablação por laser pulsado; Nanopartículas de ouro; Citotoxicidade; Espécies reativas de oxigênio (EROs); Espécies reativas de nitrogênio (ERNs); RAW 264.7

Abstract

Gisbert, M. Tommaso Del Rosso. **Characterization of gold nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in water, and analysis of cytotoxicity and modulation of the production of reactive oxygen and nitrogen species in RAW 264.7 macrophages.** Rio de Janeiro, 2022. 202p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

With the advent of the COVID-19 pandemic, numerous studies on the disease were initiated, a disease originated from a cytokine storm. Although vaccines are effective in combating the spread of COVID-19 and, more recently, the antiviral drug Paxlovid™ has been approved by ANVISA (Brazilian Health Regulatory Agency) for the treatment of COVID-19, studies on forms of treatment are still needed. Among the new therapeutic strategies, the use of gold nanoparticles (AuNPs) has been in the spotlight due to their potential anti-inflammatory effect. This work aims to study the potential anti-inflammatory properties of AuNPs, synthesized by pulsed laser ablation (PLA) in water, in RAW 264.7 macrophages. Furthermore, the present work aimed to investigate the possible connection between the immunomodulatory effect of the nanoparticles and the secondary products obtained through the CO₂ reduction reaction (CO₂RR) activated by PLA in water. In this sense, we analyzed the proliferation, cytotoxicity, levels of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in RAW 264.7 macrophages subjected to treatment with AuNPs and exposed to lipopolysaccharide (LPS), which was used as a precursor agent of the inflammatory process. In conclusion, the results showed that the AuNPs at a concentration of 10µg/mL did not have a cytotoxic character and reduced ROS and RNS. AuNPs demonstrated promising anti-inflammatory activity with reduced cytotoxicity values, which points to future clinical applications.

Keywords

Pulsed laser ablation, Gold nanoparticles; Cytotoxicity; Reactive oxygen species (ROS); Reactive nitrogen species (RNS); RAW 264.7

Sumário

1 Introdução.....	1
1.1 Estado da arte.....	1
1.2 Objetivos e métodos.....	3
1.3 Contribuições e infraestrutura	4
1.4 Organização.....	5
 2 Fundamentos teóricos.....	 7
2.1 Nanopartículas	7
2.2 Síntese de nanopartículas	8
2.3 Ablação a laser.....	11
2.3.1 Parâmetros relacionados ao laser.....	16
2.3.2 Parâmetros relacionados ao material	17
2.3.3 Processo de produção do CO ₂ RR na PLA	18
2.4 Propriedades ópticas das nanopartículas de metais nobres	23
2.4.1 Aproximação quase-estática (QSA)	26
2.5 Raman.....	29
2.5.1 Espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS)	34
2.6 Aplicação do ouro e das nanopartículas de ouro na medicina.....	36
2.7 Inflamação	38
2.7.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas a nitrogênio (ERNs).....	43
2.7.2 Papel dos macrófagos na inflamação.....	45
2.7.3 Linhagem celular RAW 264.7.....	47
2.8 COVID-19	48
2.9 Nanopartículas de ouro com propriedade anti-inflamatória e com liberação controlada de monóxido de carbono (CORMs).....	52
2.10 Relevância do tema da pesquisa	57
 3 Métodos experimentais	 59
3.1 Instrumentação.....	59
3.2 Materiais.....	60

3.2.1	Preparo da solução de hidróxido de sódio (NaOH)	61
3.2.2	Pluronic PF127	61
3.3	Limpeza	63
3.3.1	Vidros e béqueres de teflon	63
3.3.2	Alvo de ouro	64
3.4	Síntese da dispersão coloidal de nanopartículas de ouro via PLA	65
3.4.1	Cálculo da fluência do pulso laser	69
3.5	Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	71
3.6	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	73
3.7	Liofilização	73
3.8	Espectroscopia de fotoluminescência	74
3.9	Espectroscopia Raman	75
3.9.1	Preparação das amostras para as espectroscopias Raman e SERS	77
3.10	Difração de raios X (DRX)	78
3.10.1	Preparação das amostras para DRX	78
3.11	Cultivo celular	79
3.12	Contagem de células	81
3.13	Preparo das nanopartículas de ouro para o tratamento em macrófagos	83
3.14	Ensaio de viabilidade celular	84
3.15	Ensaio de proliferação celular	85
3.16	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	87
3.17	Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	89
3.18	Avaliação morfológica por meio da microscopia óptica invertida de contraste de fase	90
3.19	Avaliação morfológica por meio da microscopia de varredura (MEV)	90
4	Resultados e discussão	91
4.1	Caracterização	91
4.1.1	UV-Vis e ICP-MS	91
4.1.2	Potencial Zeta	95
4.1.3	Espectroscopia de fotoluminescência	97
4.1.4	Espectroscopia Raman	99
4.1.5	Difração de raios X (DRX)	105
4.1.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	110
4.1.7	Conclusão segundo as características físico-químicas das AuNPs	112

4.2	Análise biológica	113
4.2.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI)..	113
4.2.2	Viabilidade celular.....	116
4.2.3	Proliferação	122
4.2.4	Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	124
4.2.5	Espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	128
4.2.6	Avaliação morfológica por meio da microscopia óptica invertida de contraste de fase.....	130
4.2.7	Avaliação morfológica por meio da microscopia de varredura (MEV)	134
4.2.8	Conclusão segundo a aplicação biológica das AuNPs.....	136

5 Conclusões e Perspectivas 139

5.1	Produtos provenientes do processo de CO ₂ RR induzido por PLA do alvo de metal de transição em água	139
5.2	Efeito imunomodulador das AuNPs e dos produtos secundários obtidos através da CO ₂ RR.	140
5.3	Perspectivas futuras.....	141

Material suplementar 142

A.1	Difração de raios X (DRX).....	142
A.1.1	Preparo da amostra dialisada	145
A.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	145
A.2.1	Índice de Polidispersidade (PDI)	147
A.2.2	Potencial Zeta.....	148
A.2.3	Preparo das amostras para a análise de espalhamento dinâmico de luz e Potencial Zeta	148
A.3	Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).....	149
A.3.1	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)	151
A.3.2	Preparação das amostras para TEM e EDS	152
A.4	Microscópio eletrônico de varredura (MEV)	152
A.4.1	Preparação das amostras para MEV	153
A.5	Microscópio de fluorescência	155
A.6	Microscópio óptico invertido de contraste de fase.....	156
A.7	Ensaio de viabilidade celular por MTT	157
A.8	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	158
A.9	Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs).....	158

A.10 Preparo do material transparente para análise de Fotoluminescência.....	159
--	-----

Referências.....	160
-------------------------	------------

Lista de Figuras

Figura 1.1: Fluxograma geral da metodologia utilizada para a pesquisa.	4
Figura 2.1: Escala de comprimento e a representação de materiais com tamanhos correspondentes ao macro, micro, nano e sub-materiais. Adaptado de [45].....	7
Figura 2.2: Diferentes abordagens de síntese das nanopartículas [52]	8
Figura 2.3: Métodos convencionais de síntese de nanopartículas [57]	9
Figura 2.4: Representação esquemática da pluma de plasma gerada após a interação do laser com o alvo de metal. O plasma abrange a região (I) próxima ao alvo na qual é constituída apenas por íons metálicos (M) enquanto a região (II) corresponde a uma combinação de íons e espécies excitadas de metal (M), líquido (L) e gás(G), simbolicamente representado por $M^{*+} + L^{*} + G^{*}$. A região (III) corresponde ao meio líquido contendo as espécies metálicas (M), espécies ionizadas do líquido (L) e o gás (G). Adaptado de [39].	13
Figura 2.5 Esquema dos principais estágios da PLA em solução líquida. O processo do PLA se inicia com a absorção do pulso de laser pelo alvo formando uma pluma de plasma, contendo o material ablado, que se expande no líquido circundante, seguida pela emissão de uma onda de choque. Durante a expansão, a pluma de plasma esfria, liberando energia para a solução líquida, gerando, assim, uma bolha de cavitação que se expande no líquido e em seguir colapsa em uma escala de tempo da ordem de centenas de microssegundos, por meio da emissão de uma segunda onda de choque. Adaptada da referência [37].	14
Figura 2.6: Representação do resumo dos diferentes tipos de composição superficial da dispersão coloidal das nanopartículas de ouro em obtidos de PLA em água e em diferentes solventes orgânicos. Adaptado de [37].....	18
Figura 2.7: Esquema proposto dos processos físico-químicos envolvidos na redução de CO ₂ RR por nanorreatores de Au/AuO durante PLA de ouro. (A) WS de uma etapa e CO ₂ RR complementam-se, levando à formação de gases (H ₂ , O ₂ , CO) e possíveis ácidos carboxílicos (R-COOH). (B) A câmara de reação para o CO ₂ RR em duas etapas é constituída pelas bolhas permanentes produzidas durante o PLA, contendo CO ₂ , O ₂ , H ₂ e CO obtidas durante o processo de redução em uma etapa. Após mais excitação, ocorre a hidrogenação direta do CO ₂ pelo processo molecular H ₂ e Fischer-Tropsch (FT), levando à produção de	

hidrocarbonetos e álcoois. Este último, pode sofrer ainda uma reação de redução catalítica (RR), que cria unidades de construção $-C_n-$, eventualmente condensando na forma de nano-material de carbono sólido. A energia de ativação E ($h\nu$, kT) pode ser dada tanto por rotas térmicas quanto ópticas.....22

Figura 2.8: A taça Lycurgus iluminada por fora (esquerda) e por dentro (direita) [127].....23

Figura 2.9: Esquema de plasmon de superfície localizada (LSP, da acrossemia Localized Surface Plasmon) de uma nanopartícula metálica. Adaptado de [126].25

Figura 2.10: Diagrama esquemático de uma nanopartícula esférica de raio a , sob a excitação de um campo elétrico estático uniforme polarizado ao longo do eixo Z. Considerando o estudo da aproximação quase-estática simples (QSA) temos $a \ll \lambda$. Adaptado de [132].....27

Figura 2.11: Esquema do espalhamento Rayleigh e Raman. Adaptado de [136].30

Figura 2.12: Diagrama de energia eletrônica de uma molécula. No espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico) temos a conservação da frequência ω_0 . No espalhamento Raman (inelástico), a componente $\omega_0 - \omega_m$ é responsável pelo shift em direção ao vermelho, tendo, portanto, o espalhamento Raman Stokes. Porém, a componente $\omega_0 + \omega_m$ é responsável pelo shift em direção ao azul, que, por sua vez, está relacionada ao espalhamento Raman Anti-Stokes. Adaptado de [140].....33

Figura 2.13: Resumo esquemático do princípio da espectroscopia SERS. A intensidade de entrada e espalhada são amplificadas pelo fator $|A(\omega_S)|^2 |A(\omega_L)|^2$. Adaptado de [38].36

Figura 2.14: Representação esquemática das etapas de migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos durante a resposta inflamatória. Os leucócitos (no esquema são mostrados os neutrófilos) primeiro rolam, em seguida são ativados e aderem ao endotélio, posteriormente transmigram através do endotélio rompendo a membrana basal e migrando em direção aos quimiocinas que emanam da fonte da lesão. Em que Sialyl-LewisX (sLex) é um glicano envolvido no extravasamento via ligação de selectina e PECAM-1 é uma molécula de adesão celular endotelial plaquetária. Adaptado de [148].....40

Figura 2.15: Representação esquemática da fagocitose de um patógeno. (1) A fagocitose de um patógeno envolve a fixação e a ligação da partícula a receptores

na superfície leucocitária. (2) Fase relacionada ao englobamento e fusão do vacúolo fagocítico com grânulos (lisossomos). (3) Etapa correspondente a destruição do patógeno ingerida. Sabendo que iNOS corresponde a sintase de óxido nítrico induzível, NO é o óxido nítrico e EROs são as espécies reativas de oxigênio. Adaptado de [148]. 42

Figura 2.16: Esquema das fontes endógenas e exógenas do estresse oxidativo, e, portanto, da origem das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ($\text{OH}^\bullet$ = radical hidroxila; $\text{O}_2^{\bullet-}$ = ânion superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $\text{NO}^\bullet$ = radical óxido nítrico; NO_3 = peroxinitrito; NO_2 = dióxido de nitrogênio). Adaptada de [155]. 44

Figura 2.17: Representação do equilíbrio entre os macrófagos M1 e M2. Adaptado de [160]. 47

Figura 2.18: Representação esquemática das etapas da infecção nas células pulmonares ocasionadas pelo vírus SARS-CoV-2. Adaptado de [171]. 51

Figura 3.1: Estrutura química do copolímero anfifílico Pluronic® F127. Adaptado de [181] e [182]. 62

Figura 3.2: (A) Fonte de laser Nd:YAG pulsado Q-smart 850 da Quantel, operado com módulo para a frequência do segundo harmônico 2ω . (B) Detector piroelétrico de energia. (C) Controle do laser Q-smart 850. 65

Figura 3.3: Esquema experimental utilizado para PLA. O feixe laser incide no divisor de feixe (BS), em seguida cada um dos feixes divididos incide, respectivamente, nos espelhos E_1 e E_2 , que por sua vez desvia o feixe de laser para as respectivas lentes L_1 e L_2 , na qual focaliza o feixe até os alvos A_1 e A_2 imersos no líquido. 66

Figura 3.4: (A) Configuração experimental para a síntese de AuNPs por PLA (na imagem foram utilizados béqueres de vidro por finalidade, meramente, didática). (B) Béquer de teflon com a solução de NaOH e o alvo de ouro antes da PLA. (C) Béquer de teflon com a dispersão coloidal de AuNPs e o alvo de ouro logo após a PLA. 66

Figura 3.5: (A) Configuração experimental para o preparo da amostra em atmosfera controla. (B) Sistema de PLA em atmosfera controlada (em que E representa o espelho e L a lente). 68

Figura 3.6: Configuração geométrica para o cálculo do diâmetro do pulso laser ao incidir no alvo e da fluência do laser.....	69
Figura 3.7: Esquema experimental de um espectrofotômetro UV-Vis.	72
Figura 3.8: Amostra liofilizada das AuNPs, sintetizadas por PLA, com 2mM de NaOH.	74
Figura 3.9: Esquema do espectrofluorímetro da Photon Technology International (PTI) modelo Quanta Master™ 40: 1. Lâmpada de Xenônio (Xe) 75W; 2. Fendas ajustáveis; 3. Módulo monocromador de excitação; 4. Câmara da amostra; 5. Lentes para focalização; 6. Suporte para a amostra; 7. Módulo monocromador de emissão; 8. Fotomultiplicadora. Adaptado de [197].....	75
Figura 3.10: Esquema experimental simplificado da espectroscopia Raman. Partindo da fonte laser o feixe monocromático passa pelo Filtro ND (filtro de densidade neutra, cuja finalidade é reduzir a quantidade de luz que entra na lente) e por um polarizador. Na sequência o feixe de luz laser passa pelo espelho dicróico permitindo que esse feixe chegue até a lente objetiva. Assim, a amostra é iluminada pelo feixe de laser, que por sua vez é espalhado por ela. Em seguida, o feixe espalhado retorna pela objetiva e pelo espelho dicróico. Nesse caso, o espelho dicróico atua como um filtro rejeita-faixa que impede a passagem de uma parte da luz espalhada que apresenta o mesmo comprimento de onda da fonte laser. Posteriormente, o feixe de laser atravessa o filtro de passagem de banda (filtro Notch) cuja finalidade é filtrar o restante da luz espalhada (Espalhamento Rayleigh) que apresenta o mesmo comprimento de onda da fonte laser que não foi bloqueada ao passar pelo espelho dicróico. A luz espalhada que não apresenta o mesmo comprimento de onda da fonte laser (Espalhamento Raman) é enviada ao monocromador, no qual separa os feixes de luz nos respectivos comprimentos de onda e o detector tipo CCD (dispositivo de carga acoplada, do inglês Charge-Coupled Device) capta e transmite o sinal para a interface computacional a fim de ser analisado por um software e, conseqüentemente, gerar o espectro de intensidade da luz espalhada, isto é o espectro Raman. Adaptado de [198].....	76
Figura 3.11: Principais componentes do espectrômetro Raman Xplora confocal da HORIBA utilizado para a análise.....	77
Figura 3.12: Dispersão coloidal de AuNPs depositadas (4, 8 e 12 gotas) no substrato de silício.	77

Figura 3.13: AuNPs com 2mM de NaOH feita em ar e liofilizadas depositadas no substrato de vidro.....	78
Figura 3.14: (A) Microscópio óptico invertido (Zeiss™ Primo Vert™) com câmera acoplada e conectado a uma interface computacional. (B) Imagem obtida da célula RAW 264.7 por meio do software ZEN Lite disponibilizado pelo fornecedor.....	80
Figura 3.15: Representação da câmara de Neubauer. As letras A, B, C e D representam os 4 quadrantes usados para contagem celular. Cada dos quatros quadrantes são compostos por 16 retículos menores [200].....	81
Figura 3.16: Representação esquemática da metodologia utilizada para a contagem celular.	82
Figura 3.17: Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular por MTT.	85
Figura 3.18: Representação esquemática do ensaio de proliferação celular.	87
Figura 4.1: (A) Dispersão coloidal de AuNPs produzidas por PLA em ar. (B) Dispersão coloidal de AuNPs sintetizadas via química. (C) Dispersão coloidal de AuNPs sintetizadas por PLA em atmosfera controlada com N ₂	92
Figura 4.2: Espectros de extinção não normalizados das dispersões coloidais de AuNPs. Espectro de extinção das AuNPs com Pluronic® F127 foram representados por meio das linhas pontilhadas, enquanto os espectros sem o Pluronic® F127 correspondem a linha sólida.	93
Figura 4.3: Espectros de extinção normalizado a 1 das dispersões coloidais de AuNPs. Espectro de extinção das AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH sintetizadas por PLA em ar ambiente (vermelho e azul), espectro de extinção das AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas por PLA em atmosfera controlada de N ₂ (roxo) e espectro de extinção das AuNPs sintetizadas por via química (verde). Todos os espectros de extinção foram realizados na ausência de Pluronic® F127.....	94
Figura 4.4: Gráfico da análise no DLS do potencial Zeta das dispersões de AuNPs sintetizadas por PLA em água.	96
Figura 4.5: Permeabilidade da membrana celular. Adaptada de [209].....	97
Figura 4.6: Espectro de fotoluminescência do cluster obtido a partir da dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH (linha pontilhada). Espectro de	

fotoluminescência da dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH (linha sólida).....	98
Figura 4.7: Imagem obtida por meio do espectrômetro Raman Xplora confocal da HORIBA das AuNPs sintetizados por PLA feita em ar com $C_{\text{NaOH}} = 4,00\text{mmol/L}$ seca em ar e depositadas no vidro.	100
Figura 4.8: Resposta SERS das AuNPs sintetizados por PLA com $C_{\text{NaOH}} = 4,00\text{mmol/L}$ seca em temperaturas distintas. O comprimento de onda de excitação para a análise foi igual a 638nm. *AuNPs com 4mM de NaOH em atmosfera controla de N_2	100
Figura 4.9: Resposta SERS das AuNPs sintetizados por PLA em atmosfera ambiente com $C_{\text{NaOH}} = 2,00\text{mmol/L}$ depositadas sobre o substrato de silício e seca em forno a vácuo à 40°C. O comprimento de onda de excitação para a análise foi igual a 638nm.	103
Figura 4.10: Gráfico de Bjerrum mostrando as proporções relativas do equilíbrio químico entre ácido carbônico (em verde), bicarbonato (em vermelho) e o carbonato (em azul). Adaptado de [212].	104
Figura 4.11: Espectro Raman das AuNPs sintetizados por PLA em atmosfera ambiente com $C_{\text{NaOH}} = 2,00\text{mmol/L}$ e liofilizadas. Nessa amostra não foi possível observar a frequência 2124cm^{-1} típica do Au-carbonil, entretanto, foi possível identificar uma frequência na região 1073cm^{-1} . O comprimento de onda de excitação para a análise foi igual a 785nm.	105
Figura 4.12: Padrão de DRX das amostras de AuNPs com diferentes concentrações de NaOH.	106
Figura 4.13: Padrão de DRX da solução de NaOH (8mM) e das amostras com e sem diálise das AuNPs com 8mM de NaOH.	107
Figura 4.14: Padrão de DRX da AuNPs com 4mM de NaOH sintetizadas por PLA em água e em ar (em amarelo) e as fases encontradas no mapeamento da amostra, sendo elas: ouro (em rosa), Nahcolite (em verde), Trona (em preto) e acetato de sódio (em azul).	108
Figura 4.15: Imagens obtidas por microscopia de transmissão (MET) das AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas em ar por PLA em água. (A) Distribuição bimodal dos tamanhos das AuNPs. (B) AuNPs com raio de aproximadamente $2,6 \pm 0,5\text{nm}$. (C) AuNPs com raio de aproximadamente $1,9 \pm 0,2\text{nm}$	110

Figura 4.16: Espectroscopia por Energia dispersiva de Raios X (EDS) das nanopartículas de ouro sintetizada por PLA. Identificação dos elementos Au, Na e O. A tensão de aceleração de elétrons foi mantida em 200kV.....	111
Figura 4.17: Distância interplanar das AuNPs com 2mM de NaOH sintetizada em ar por PLA em água, obtidas por meio das imagens de microscopia de transmissão (MET).	111
Figura 4.18: Dados obtidos por meio da análise de DLS para uma distribuição do número por diâmetro hidrodinâmico das AuNPs produzidas por PLA feitas em ar ambiente. As imagens (A) e (B) correspondem, respectivamente a distribuição para AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH + PF127. As imagens (C) e (D) correspondem, respectivamente a distribuição para AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH + PF127 em meio de cultura DMEN-HIGH.	114
Figura 4.19: Índice de polidispersão (PDI) das AuNPs produzidas por PLA feitas em atmosfera ambiente na ausência e presença do meio de cultura DMEM-HIGH.....	115
Figura 4.20: Células tratadas com as AuNPs e submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT.....	116
Figura 4.21: Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média normalizada dos dados brutos da leitura das absorvâncias a 570nm em relação ao controle, expresso em porcentagem $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$	118
Figura 4.22: Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média normalizada dos dados brutos da leitura das absorvâncias a 570nm em relação ao controle, expresso em porcentagem $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$	119
Figura 4.23: Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média normalizada dos dados brutos da leitura das absorvâncias a 570nm em relação ao controle, expresso em porcentagem $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com	

múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$ 120

Figura 4.24: Ensaio de proliferação celular dos macrófagos RAW 264.7 tratadas com nanopartículas de ouro via ablação a laser. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste Two-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$ 123

Figura 4.25: Ensaio de proliferação celular dos macrófagos RAW 264.7 tratadas com nanopartículas de ouro via síntese química. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste Two-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$ 124

Figura 4.26: Avaliação da presença da EROs em macrófagos RAW 264.7 tratados com AuNPs via ablação a laser em atmosfera controlada. Os resultados dos ensaios de EROs foram descritos pelas unidades relativas de fluorescência $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle para as análises sem LPS e ao grupo controle LPS para as análises com LPS. O valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$. . 125

Figura 4.27: Avaliação da presença da EROs em macrófagos RAW 264.7 tratados com AuNPs. Os resultados dos ensaios de EROs foram descritos pelas unidades relativas de fluorescência $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle para as análises sem LPS e ao grupo controle LPS para as análises com LPS. O valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$ 126

Figura 4.28: Curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) utilizada para a determinação da concentração de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cultura dos macrófagos RAW 264.7. 129

Figura 4.29: Efeito das AuNPs na produção de nitrito nos macrófagos RAW 264.7. Os macrófagos RAW 264.7 foram expostas a $1\mu\text{g/mL}$ de LPS na presença ou ausência de AuNPs. O meio com as células não tratadas foi denominado de controle. O tratamento com LPS produz aumento dos níveis de nitrito, enquanto o

tratamento com AuNPs mediante a exposição ao LPS reduz os níveis de nitrito.

..... 129

Figura 4.30: Análise morfológica dos macrófagos RAW 264.7 após 24h de exposição a diferentes tratamentos com AuNPs na concentração de 10µg/mL. Houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM-HIGH, Triton representa as células mortas e PF-127 representa as células cultivadas em DMEM-HIGH com Pluronic® F127. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 100µm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição. 131

Figura 4.31: Análise morfológica dos macrófagos RAW 264.7 após 48h de exposição a diferentes tratamentos com AuNPs na concentração de 10µg/mL. Houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM-HIGH, Triton representa as células mortas e PF-127 representa as células cultivadas em DMEM-HIGH com Pluronic® F127. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 100µm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição. 132

Figura 4.32: Análise morfológica dos macrófagos RAW 264.7 após 72h de exposição a diferentes tratamentos com AuNPs na concentração de 10 µg/mL. Houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂ e nos macrófagos tratados com as AuNPs produzidas por via química e sem Pluronic® F127. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM-HIGH, Triton representa as células mortas e PF-127 representa as células cultivadas em DMEM-HIGH com Pluronic® F127. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 100µm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição. 133

Figura 4.33: Imagens de microscopia de varredura (MEV) da célula RAW 264.7 de amostras controle (A e D) e tratadas com AuNPs com 2mM de NaOH e PF127 (B e E) e com AuNPs com 2mM de NaOH (C e F). As setas em vermelho indicam

a morfologia mais alongada e a seta em azul indica a morfologia mais arredondada. 135

Figura A.1: (A) Diagrama esquemático de um difratômetro de raios X, no qual é constituído por uma fonte fixa de raios x, um detector e o porta amostra. Adaptado de [221]. (B) A amostra é colocada no ponto S (porta-amostra) e as rotações em torno do eixo O são possíveis. O feixe de raios X é gerado no ponto T, e as intensidades dos feixes difratados são detectadas por um detector indicado pela letra C. A amostra, a fonte de raios X e o detector são coplanares. O detector é montado em um carro móvel que também pode ser girado em torno do eixo O. O carro e o porta amostra são acoplados mecanicamente de tal forma que uma rotação da amostra em θ é acompanhada por uma rotação de 2θ do detector, garantindo que os ângulos de incidência e de reflexão sejam mantidos iguais entre si. À medida que o detector se move em velocidade angular constante, registra automaticamente a intensidade do feixe difratado em função de 2θ , isto é, do ângulo de difração. Adaptado de [222]. 142

Figura A.2: Condição geométrica para difração de raio X por planos cristalinos. Supondo que dois planos paralelos A-A' e B-B' são separados pelo espaçamento interplanar d. O feixe paralelo, monocromático e coerente de raios x de comprimento de onda λ incide nesses dois planos em um ângulo θ . Os raios denominados de 1 e 2, são espalhados pelos átomos P e Q. A interferência construtiva dos raios espalhados 1 e 2 ocorre também em um ângulo θ em relação aos planos se a diferença de comprimento de caminho entre 1-P-1' e 2-Q-2' (ou seja, $SQ + QT$) é igual a um número inteiro, n, de comprimentos de onda λ . Adaptado de [222]. 143

Figura A.3: Análise de difratometria de raio X para monocristais. Amplificação do pó da dispersão coloidal de nanopartícula de ouro depositada na haste do difratômetro (porta amostra). 144

Figura A.4: Esquema de funcionamento da técnica espalhamento dinâmico de luz (DLS), em que a luz espalhada por partículas iluminadas por um laser é medida com alta resolução de tempo sob um ângulo θ definido. A flutuação do sinal de espalhamento reflete a dinâmica dos processos microestruturais, como o movimento browniano das partículas. Adaptado de [224]. 146

Figura A.5: Representação da relação entre o tamanho hidrodinâmico e o tamanho real do núcleo metálico das NPs. O tamanho hidrodinâmico medido por DLS é sempre maior do que o tamanho dos NPs medidos por TEM [38]......	147
Figura A.6: Aparelho de espalhamento dinâmico de luz (DLS) ZetaSizer Nano Series – ZS localizado no Laboratório de Biotecnologia (Labio) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).	149
Figura A.7: Componentes óptica de um microscópio eletrônico de transmissão no modo imagem. Adaptado de [230].	150
Figura A.8: Microscópio eletrônico de transmissão JEOL 2100F localizado no Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).	151
Figura A.9: Esquema básico de um microscópio de varredura (MEV). Adaptado de [234].	153
Figura A.10: Esquema básico de um microscópio de fluorescência.	155
Figura A.11: Microscópio óptico de epifluorescência automatizado, InCell Analyzer 2000, localizado no Laboratório de Biotecnologia (LABIO) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).	156
Figura A.12: Redução do MTT a Formazan [242].	157
Figura A.13: Estruturas químicas de dihidroetídio, 2-hidroxi-etídio e etídio [245].	158

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Principais métodos para síntese de nanopartículas metálicas e suas vantagens e desvantagens.....	10
Tabela 2.2: Citocinas envolvidas na inflamação e suas funções.....	40
Tabela 2.3: Visão geral sobre o potencial anti-inflamatório de nanopartículas de ouro em macrófagos RAW 264.7	54
Tabela 2.3: (Continua)	55
Tabela 2.4: Busca em base de dados.....	58
Tabela 3.1: Tratamentos e concentrações utilizadas no ensaio de viabilidade celular.....	84
Tabela 3.2: Tratamentos e concentrações utilizadas no ensaio de proliferação celular.....	86
Tabela 4.1: Parâmetros da síntese de AuNPs por PLA em água.....	91
Tabela 4.2: UV-Vis das dispersões coloidais de AuNPs.....	94
Tabela 4.3: Valor da concentração de ouro medida por ICPMS	95
Tabela 4.4: Potencial Zeta das dispersões para as AuNPs sintetizadas por PLA.....	96
Tabela 4.5: Frequências SERS das AuNPs sintetizadas em ar e em atmosfera controlada com N ₂	101
Tabela 4.6: Fases encontradas nas AuNPs com 4mM de NaOH.....	109
Tabela 4.7: Médias normalizadas da absorvância obtidas no ensaio de viabilidade celular.....	121
Tabela 4.8: Dados estatísticos obtido no ensaio das EROs	127

Lista de Abreviação

Ag	Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	Argônio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Au	Ouro
AuNPs	Nanopartícula de ouro
BS	Divisor de feixe
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₂ RR	Processo de redução da CO ₂
CORMs	Moléculas liberadoras de óxido de carbono
COVID-19	Coronavírus 19
CRS	Síndrome de liberação de citocinas
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DHE	Dihidroetídio
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM-HIGH	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
E	Energia
EDS	Espectroscopia por Energia dispersiva de raios X
ERNs	Espécies reativas a nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETC	Cadeia Transportadora de Elétrons
EthD-1	Etídio
F	Fluência
Fe	Ferro
FT	Processo Fischer-Tropsch
H ₂	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HER	Reação de evolução de hidrogênio
ICP-MS	Espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucinas
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
KCl	Cloreto de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LSP	Plasmon de superfície localizada

LSPR	Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada
M1	Macrófagos com fenótipo pró-inflamatório
M2	Macrófagos com fenótipo anti-inflamatório
MAS	Síndrome de ativação macrofágica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Complexo enzimático nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-hidrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NMs	Nanomateriais
NO	Óxido Nítrico
NPs	Nanopartículas
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C reativa
PCT	Procalcitonina
PDI	Índice de polidispersão
PEO	Polioxietileno
PF127	Pluronic® F127
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ablação a laser pulsado
PPO	Polioxipropileno
PRRs	Padrão de superfície celular
QSA	Aproximação quase-estática
RAW 264.7	Células macrófagos
RWGS	Reação de deslocamento reverso água-gás
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave-coronavírus-2
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SERS	Espectroscopia Raman Amplificada pela Superfície
SFB	Soro fetal bovino
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SP	Plasmons de superfície
SPP	Plasmon-polariton de superfície
SPPR	Ressonância de polariton-plasmon de superfície
TGF-β	Fator de transformação do crescimento-β
TLRs	<i>Toll-like</i>

TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFR	Unidades relativas de fluorescência
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV-Vis	Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível
WS	Processo de separação da molécula da água
φ_A	Diâmetro da região de interação do pulso laser com o alvo
φ_L	Diâmetro do pulso laser
ω	Primeiro harmônico
2ω	Segundo harmônico

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

1

Introdução

1.1 Estado da arte

A pandemia da COVID-19 teve início em dezembro de 2019, com os primeiros casos registrado em Wuhan, na China. Diante da expansão drástica da COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou emergência sanitária global em março de 2020. Segundo os dados da OMS, a pandemia de COVID-19 causou mais de 6 milhões mortes em todo o mundo [1]. De acordo com último levantamento da OMS, reportado no dia 29 de julho de 2022, no Brasil houve 33.704.393 casos confirmados e 677.804 de vítimas fatais [2].

Diante desse cenário muitos estudos foram efetuados sobre a COVID-19, em que a mortalidade ocasionada pela doença se revelou associada a tempestade de citocinas [3]. A tempestade de citocinas está correlacionada a uma resposta inflamatória intermediada principalmente pelos macrófagos [4-9]. Na COVID-19, a ativação descontrolada dos macrófagos corrobora para um processo de hiperinflamação, em particular a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) [3, 6, 9, 10], e é acompanhada por um elevado estresse oxidativo, que contribui para o aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) e das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) [6], de tal forma que esse aumento implica na possível fibrose pulmonar e na exacerbação da doença [6, 9, 11, 12]. O rápido desenvolvimento de vacinas eficazes foi imprescindível contra a difusão do COVID-19 [13, 14]. Atualmente foi aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA (Estados Unidos da América), *European Medicines Agency* da União Europeia e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o fármaco antiviral Paxlovid™, da Pfizer, no tratamento da COVID-19 leve a moderada, todavia essa medicação só atende adultos que não necessitam de oxigênio suplementar e que apresentam risco de progressão para o caso mais grave da doença, além do fato da segurança e da eficiência do Paxlovid™ para o tratamento da COVID-19 ainda ser objeto de estudo [12, 13].

Nessa conjuntura, torna-se imprescindível pesquisas sobre métodos de ação não tradicionais que possam potencializar ou desencadear os efeitos terapêuticos desejados. Nessa perspectiva, o campo da Nanomedicina é fundamental para o estudo de terapias não convencionais. A Nanomedicina vem se desenvolvendo nas últimas décadas e apresenta uma vasta abrangência em diferentes abordagens consonantes da medicina, química, física, engenharia e biologia, com finalidade comum de controlar e defender a saúde do corpo humano [14, 15].

Em âmbito da teranóstica [16], que inclui métodos terapêuticos e diagnósticos em um único sistema, as nanopartículas (NPs) tem definitivamente o papel mais importante e abrangente [16-18], sendo usadas na geração de imagens, terapias fotodinâmica e térmica para cura de câncer, ou entrega de drogas [17, 18]. Outros estudos reportam também efeitos antibacterianos (Ag, Au, CuO, ZnO, TiO₂ e Al₂O₃) [19], antifúngicos (Ag, Au e Cu) [20-22], antivirais (Ag, Au, TiO₂) [23], anti-angiogênicos (Au) [24] ou anti-inflamatórios (Ag, Au e ZnO) [24, 25] das NPs.

Apesar da ampla gama de materiais usados para a síntese de NPs, as nanopartículas de ouro (AuNPs) estão entre as mais investigadas nas últimas décadas, devido ao fato de apresentar alta estabilidade térmica e baixa volatilidade, não serem citotóxicas, não serem imunogênicas, serem facilmente funcionalizáveis, e apresentarem propriedades ópticas do tipo plasmônica [26-28]. Estudos mais recentes apontam que as AuNPs sintetizadas por via química podem ter efeito imunomodulador com ação anti-inflamatória [24, 25, 29-35] e que os mecanismos físico-químicos associados à modulação da resposta inflamatória em macrófagos são a redução da produção de EROs e/ou ERNs.

Sendo assim, é de extremo interesse investigar as eventuais propriedades anti-inflamatórias de AuNPs e nesse sentido o presente trabalho preconiza o estudo das AuNPs sintetizadas por ablação por laser pulsado (PLA) em água [27, 36, 37], em virtude de ainda ser incipiente o estudo sobre a potencial propriedade anti-inflamatória das AuNPs obtidas por PLA e, também, diante dos recentes resultados obtidos no *NanoLaserLab* do Departamento de Física da PUC-Rio [38, 39], onde foram sintetizadas as AuNPs, objeto da presente pesquisa. Esses resultados, apontam a criação de diferentes espécies orgânicas durante o processo

de PLA de alvos de ouro em água, devido a reação de redução da CO_2 (CO_2RR) [37, 38]. Entre os produtos da reação, foi, possivelmente, identificado via Espectroscopia Raman Amplificada pela Superfície (SERS, do inglês *Surface Enhanced Raman Scattering*) o ouro-carbonil ($\text{Au} - \text{CO}$), caracterizado por uma estreita banda em 2124 cm^{-1} [40]. Os metais de transição conjugados com monóxido de carbono (CO) foram introduzidos na última década como fármacos baseados na liberação controlada de CO, sendo denominados de moléculas para a liberação de monóxido de carbono (CORMs, da acrossemia *Carbon Oxide Releasing Molecules*) [41]. Os CORMs são ainda hoje amplamente estudados para os evidentes efeitos anti-angiogênicos e anti-inflamatórios, esses últimos associados com um efeito inibitório da produção de ERNs por meio do monóxido de carbono [41, 42].

1.2 Objetivos e métodos

Diante do contexto citado anteriormente, o presente trabalho tem como objetivos:

- I. Confirmar o processo de redução da CO (CO_2RR) durante a PLA de AuNPs em água, através da identificação dos relativos produtos através de espectroscopia Raman, SERS e difração de raios X (DRX).
- II. Realizar o estudo do possível efeito modulador das respostas inflamatórias das AuNPs em células oriundas da linhagem celular macrófagos do tipo RAW 264.7 (provenientes de camundongos e cedidas pelo *Master Bank* do Laboratório de Bioengenharia Tecidual do Inmetro - LABIO, na qual foi adquirida a partir da Coleção Americana de cultura de células - *ATCC AmericanType Culture Collection, Rockville, MD, USA*), realizando análises de proliferação celular, viabilidade celular, EROs e ERNs.
- III. Investigar uma possível ligação entre o efeito imunomodulador e os produtos secundários obtidos através da CO_2RR .

Para esse último fim, as AuNPs foram sintetizadas em soluções aquosas de NaOH em atmosfera ambiente e, também, em atmosfera controlada contendo a espécie gasosa N_2 na interface gás-líquido. Assim, foram investigadas as relativas diferenças dessas AuNPs em termos de produção de produtos secundários e seus possíveis efeitos anti-inflamatórios. A fim de obter os objetivos da presente pesquisa foi necessário utilizar diversas técnicas experimentais conforme ilustra o fluxograma (Figura 1.1) abaixo.

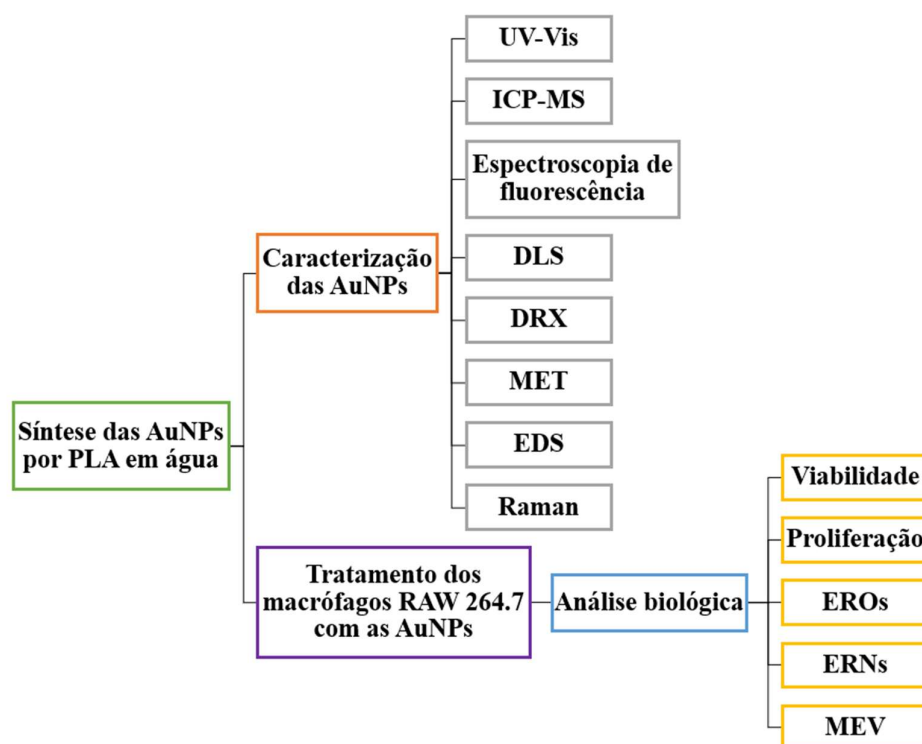


Figura 1.1: Fluxograma geral da metodologia utilizada para a pesquisa.

1.3 Contribuições e infraestrutura

A síntese das nanopartículas de ouro por PLA em água foi realizada no NanoLaserLab do Departamento de Física da PUC-Rio, sob supervisão do Prof. Dr. Tommaso Del Rosso. A espectroscopia UV-Vis foi realizada tanto no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia Óptica (localizada no Departamento de Física da PUC-Rio) quanto nos Laboratórios de Macromoléculas (LAMAC) e de Bioengenharia Tecidual (LABIO) do Instituto Nacional de Metrologia,

Qualidade e Tecnologia (INMETRO). As medidas de ICP-MS foram realizadas no Departamento de Química da PUC-Rio. A espectroscopia Raman e SERS das amostras de AuNPs também foram realizadas no Departamento de Química da PUC-Rio. A espectroscopia de fotoluminescência foi realizada tanto no Laboratório de optoeletrônica orgânica e molecular (LOEM) quanto no Laboratório de Espectroscopia de Biomoléculas, ambos situados no Departamento de Física da PUC-Rio. O processo de liofilização se deu no Laboratório *Van der Graaf* da PUC-Rio, sendo efetuado pela técnica Suellen Tozetti.

As medições de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Espectroscopia por Energia dispersiva de raios X (EDS) foram realizadas pela pós-doutorada Evelyn Christyan da Silva Santos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Estabeleceu-se uma colaboração com o Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho responsável pela Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (DIMAV) do INMETRO, para a realização de todas as análises de caráter biológico. Os macrófagos RAW 264.7 foram cedidas pelo banco de células *Master Bank* do Laboratório de Bioengenharia Tecidual (LABIO) do INMETRO. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos macrófagos RAW 264.7 tratadas com as AuNPs foram realizadas pela aluna de doutorado Natália Yoshihara, no Laboratório de Microscopia Aplicada às Ciências da Vida (LAMAV) no INMETRO. O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizado sob a supervisão do pós-doutorado, associado ao LABIO, Wanderson de Souza no INMETRO. A difração de raios X (DRX) foi realizada no INMETRO pela técnica Nathália Ramos e o estudo referente as fases cristalinas foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Alexandre Cuin da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

1.4 Organização

No Capítulo 2, “Fundamentos teóricos”, abordamos os conceitos primordiais para a compreensão da presente pesquisa. Nesse capítulo, apresentamos uma breve introdução sobre nanopartículas e alguns tipos de síntese, além da teoria do PLA de alvos metálicos, as diferenças observadas nas nanopartículas com relação ao parâmetro do material e do laser em água, e a nossa

proposta teórica para a formação de material orgânico pela CO₂RR durante a PLA em água. Ademais, mostramos o uso do ouro e das AuNPs na literatura como possível agente anti-inflamatório. Por fim, explicamos os conceitos e a conexão relacionada a inflamação e a COVID-19, procurando evidenciar da relevância pesquisa no que tange ao possível efeito imunomodulador das AuNPs. No Capítulo 3, “Métodos experimentais”, elucidamos os métodos experimentais utilizados, a descrição dos fundamentos teóricos de cada técnica e os respectivos métodos de preparação das amostras deste trabalho para cada análise realizada. No Capítulo 4, “Resultados e discussões”, mostramos os resultados e as discussões. E por fim, no Capítulo 5, “Conclusões”, apresentamos as conclusões da pesquisa e as considerações futuras do trabalho proposto. As informações suplementares estarão disponíveis no Material Suplementar.

2

Fundamentos teóricos

Esse capítulo aborda a contextualização, explicação e exemplificação referentes à fundamentação teórica em que esse trabalho se baseou.

2.1 Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) são uma ampla classe de materiais que incluem substâncias particuladas, que possuem uma dimensão que varia de 1 a 100nm [43]. O prefixo “nano” é oriundo do termo grego *nannos*, o qual pode ser interpretado como um objeto de dimensão ínfima [44]. Todavia, o prefixo é recorrentemente empregado com a finalidade de representar partículas em escala nanométrica, sendo equivalente a um bilionésimo de um metro, isto é, 10^{-9} m no Sistema Internacional de Unidades (SI, do francês *Système international d'unités*) [44]. A Figura 2.1 exibe uma escala de comprimento estabelecendo uma comparação entre os macromateriais, micromateriais, nanomateriais (NMs) e sub-materiais.

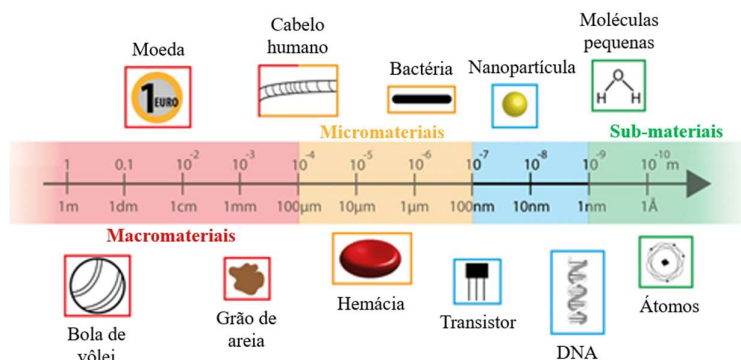


Figura 2.1: Escala de comprimento e a representação de materiais com tamanhos correspondentes ao macro, micro, nano e sub-materiais. Adaptado de [45].

A importância dos nanomateriais se deu quando os pesquisadores descobriram que o tamanho pode influenciar nas propriedades físico-químicas [32, 43]. Sendo assim, a utilização das nanopartículas encontra-se cada vez mais em ascendência, primordialmente, por conta das características inerentes às mesmas, tais como: tamanho, forma e composição adaptável, além de fornecer um

aumento da relação superfície/volume [32, 43, 46] e possuir a capacidade de ultrapassar barreiras biológicas [47]. Nesse último, estudos mostram que embora a membrana plasmática apresente uma permeabilidade seletiva as nanopartículas são capazes de entrar nas células, uma vez que elas podem sofrer mudanças físico-químicas ao entrarem em contato com fluidos biológicos havendo adsorção de proteínas na superfície da nanopartícula e consequentemente possibilitando uma maior facilidade em relação a sua entrada na célula [47-49]. No geral, essas características exclusivas das nanopartículas são responsáveis por suas propriedades multifuncionais e despertam interesse por sua aplicação em diversos campos como industriais, comerciais e até mesmo médicas [32].

2.2 Síntese de nanopartículas

Desde que o termo “nano” foi introduzido como um novo conceito na década de 1960 a preparação de nanomateriais (NMs) por meio das abordagens *bottom-up* e *top-down* tem sido o foco de estudos científicos [43, 44, 50, 51]. A abordagem *bottom-up* envolve a montagem de átomos e moléculas para gerar a nanopartícula, enquanto, a abordagem *top-down* ocorre quando promove a redução do material de maior escala em nanopartículas [44, 52] (Figura 2.2).

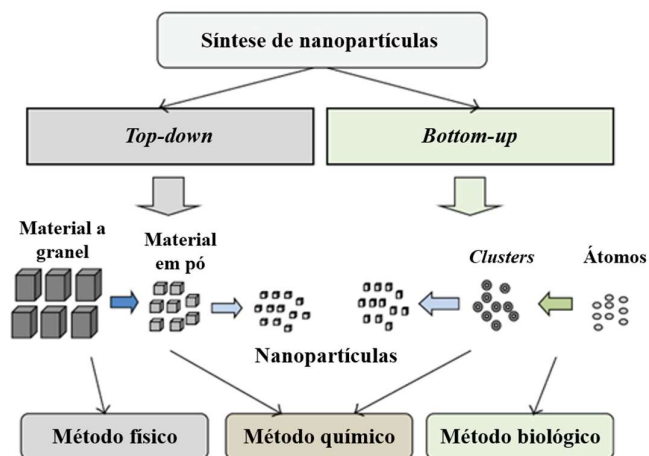


Figura 2.2: Diferentes abordagens de síntese das nanopartículas [52].

Atualmente existem três metodologias para a síntese de nanopartículas, sendo elas via: química, biológica e a física [51]. Na síntese química, a abordagem

mais comum é a redução química de íons metálicos por meio de agentes redutores orgânicos e inorgânicos, levando a formação das nanopartículas [53, 54]. A síntese biológica não utiliza produtos químicos nos protocolos de síntese e sim organismos, tais como: bactérias, fungos e plantas [53, 54]. Esses organismos produzem biomoléculas como proteínas capazes de reduzir íons metálicos que, posteriormente, aglomeram-se formando uma dispersão coloidal de nanopartículas [55]. Na síntese pelo método físico podemos citar a ablação a laser, na qual refere-se ao processo de remoção de parte de um material [56]. Essa metodologia foi utilizada para a fabricação das nanopartículas no presente trabalho e será discutida no item 2.3. A Figura 2.3 ilustra de forma resumida os principais métodos de síntese de nanopartículas. Em geral, a abordagem *bottom-up* compreende aos métodos de sínteses químicas e biológicas, já a abordagem *top-down* compreende aos métodos de sínteses químicas e físicas [44, 52].

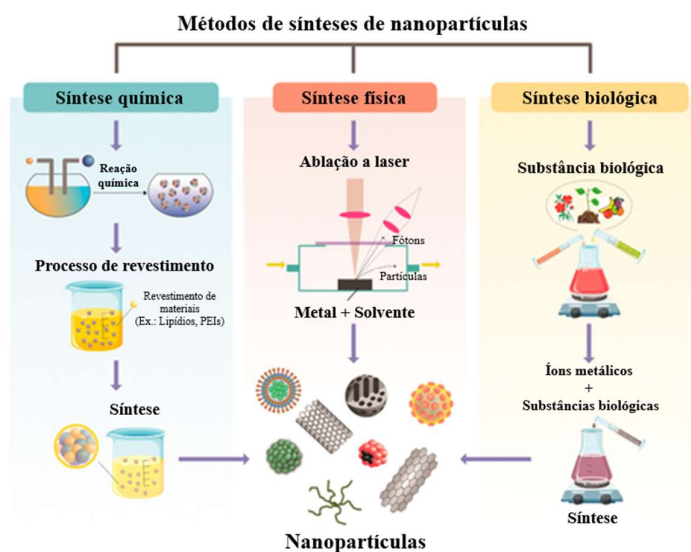


Figura 2.3: Métodos convencionais de síntese de nanopartículas [57].

Vale ressaltar a crescente relevância para as técnicas verde, isto é, técnicas *eco-friendly* para obtenção das nanopartículas. As sínteses alternativas com perfil *eco-friendly* apresentam as seguintes características: atóxicas, econômicas, de síntese rápida, ecologicamente corretas, monodispersas e com baixa produção de resíduos [58]. A Tabela 2.1 reporta as principais vantagens e desvantagens de cada método utilizado para a síntese de nanopartículas.

Tabela 2.1: Principais métodos para síntese de nanopartículas metálicas e suas vantagens e desvantagens.

Métodos de síntese	Vantagens	Desvantagens
Química	✓ Técnica relativamente simples	✓ Uso de produtos químicos tóxicos
	✓ Processo rápido	✓ Técnica pouco <i>eco-friendly</i>
	✓ Produção em larga escala	
	✓ Fácil adaptação de parâmetros	
	✓ Uniformidade de tamanho e forma	
Biológica	✓ Processo rápido	✓ Não uniformidade de tamanho
	✓ Produção em larga escala	✓ Potencial contaminação por bactérias ou fungos
		✓ Técnica <i>eco-friendly</i>
Física	✓ Técnica relativamente simples	✓ Demanda tempo
	✓ As propriedades das nanopartículas podem ser alteradas selecionando o parâmetro do laser e a natureza do líquido	✓ Produção em baixa escala
	✓ Ausência de produtos químicos tóxicos	✓ Técnica <i>eco-friendly</i>
	✓ Uniformidade de tamanho e forma	

Adaptada de [54] e [59].

2.3 Ablação a laser

A síntese de nanomateriais (NMs) por meio da ablação a laser pulsado (PLA) vem ganhando relevância nos últimos anos, por conta da sua versatilidade, baixo custo e facilidade de execução [37]. Na técnica de PLA em água, os nanomateriais são obtidos focalizando o pulso laser sobre um alvo imerso em uma solução líquida [37]. A ablação a laser é um processo de interação da luz com a matéria e está pautado justamente no processo de remoção de material do alvo sólido durante a irradiação a laser [37, 56, 60-62]. A ablação a laser em solução líquida pode ser utilizada para fabricar nanoestruturas com diversas composições, uma vez que este método envolve um líquido e um sólido, podendo escolher e combinar alvos e líquidos para fabricar as nanoestruturas de interesse [62, 63].

Comparando a síntese de nanopartículas via ablação a laser pulsado em solução líquida com a sínteses via química, pode-se dizer que a PLA em água é uma técnica verde (*eco-friendly*), visto que, é compatível com pelo menos 6 dos 12 princípios da química verde, sendo eles: eficiência atômica, síntese mais segura, produtos químicos projetados para maior segurança, uso de solventes e auxiliares mais seguros, redução da formação de derivados e química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes. Além do mais, na síntese por PLA, geralmente, usa-se água ou soluções aquosas em vez de solventes orgânico [64]. A ablação a laser também é requisitada na deposição de filmes finos [37, 65, 66], micro usinagem precisa de materiais [67], aplicações odontológicas [68, 69], cirurgia ocular [69], cirurgia dermatológica [70] e conservação de bens culturais [71].

O processo PLA, baseia-se na absorção da energia do pulso curto do laser pelos elétrons da superfície dos alvos, seguida da termalização dos fônons em tempos da ordem de picosegundos ($ps, 10^{-12}$ s) [72]. Para a realização da ablação em líquido, os parâmetros relacionados ao material (alvo, solvente e solutos, temperatura e pressão do sistema, altura do líquido) e ao pulso laser (comprimento de onda, duração, energia, taxa de repetição, número de pulsos de laser e área do *spot* laser no alvo) têm um papel fundamental na natureza química, na concentração, no tamanho e na estabilidade do nanomaterial produzido [37, 65, 73, 74]. A maior eficiência de ablação (massa de material removido por energia

de pulso) e a fluência de limiar mais baixa $F_{\min}$ (a fluência mínima necessária para haver ejeção do material) são obtidas usando um comprimento de onda mais curto [65, 75] e duração de pulso mais curta [76]. Na PLA em líquido, os átomos de um pequeno número de reagentes introduzidos no ambiente de ablação (alvo, solvente, solutos) pode-se combinar na forma de nanoestruturas suspensas em solução [77]. Sendo assim, pode-se dizer que a PLA em líquido é uma técnica híbrida que incorpora características *top-down* e *bottom-up*. O processo *top-down* está relacionado à formação do plasma com os aglomerados e fragmentos do material alvo da ablação [37, 77, 78], enquanto o processo *bottom-up* está relacionado com a recombinação do plasma em pequenos aglomerados e a sua posterior coalescência, contribuindo para a formação das nanopartículas [37, 77, 78].

A remoção de parte do material alvo por meio do pulso laser se dá pela interação entre os fótons e a superfície do alvo, onde permite a formação de um plasma sobre a região de interação com o alvo, contendo íons tanto do alvo sólido quanto do meio circundante, este último constituído pelas espécies líquidas (L) e gasosas (G) dissolvidas no seu interior, conforme ilustra a Figura 2.4 [79]. No caso da presente pesquisa, o metal (M) é o ouro (Au), o líquido é uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) e os gases dissolvidos são os constitutivos do ar (CO_2 , N_2 , O_2) para a ablação no ar ambiente e N_2 para a ablação realizada em atmosfera controlada. Conforme a distância do alvo a temperatura irá diminuir (temperatura ambiente em direção do líquido) de modo que diferentes espécies (M, L, G) estarão no estado excitado ou ionizado (indicado com um asterisco), conforme indicado na Figura 2.4. Em contraste com a literatura tradicional, incorporamos as espécies gasosas dissolvidas na água como um importante componente que participa das propriedades químicas e físicas dos nanomateriais sintetizados por PLA em água. Aludimos, particularmente, a diminuta porcentagem de CO_2 presente no ar ($\sim 0,04\%$) [80], a qual atribuímos a presença de nanomaterial orgânico na dispersão coloidal mediante ao processo de redução da CO_2 durante a PLA de alvos de metais de transição em água.

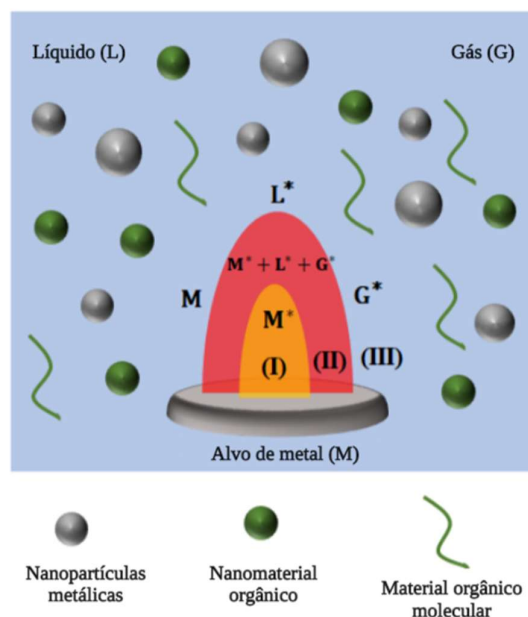


Figura 2.4: Representação esquemática da pluma de plasma gerada após a interação do laser com o alvo de metal. O plasma abrange a região (I) próxima ao alvo na qual é constituída apenas por íons metálicos (M^*) enquanto a região (II) corresponde a uma combinação de íons e espécies excitadas de metal (M^*), líquido (L) e gás (G), simbolicamente representado por $M^* + L^* + G^*$. A região (III) corresponde ao meio líquido contendo as espécies metálicas (M), espécies ionizadas do líquido (L) e o gás (G). Adaptado de [39].

Tomando o esquema representado na Figura 2.5 como exemplificação do processo de ablação a laser, temos que inicialmente, em $t < 0$, o pulso de laser é emitido passando pelo líquido até atingir o alvo. Na ablação é necessário considerar a interação do laser com o meio líquido e o efeito óptico não linear, sabendo que este último pode ser acompanhado pela quebra das moléculas do líquido [81, 82]. Os efeitos ópticos não lineares estão correlacionados com a fluência (F) do laser que nada mais é do que a energia dividida pela área de interação, medida em J/cm^2 [37, 83, 84].

Quando o laser incide no alvo sólido de metal, os elétrons do alvo sólido são excitados devido à absorção dos fótons. Como nessa etapa há uma alta densidade de fótons, tem-se absorção linear e não linear do fóton no alvo, logo, nesse caso, há dependência da fluência F e da duração do pulso laser. Posteriormente, os elétrons excitados transferem a energia para os fônons até que o equilíbrio térmico seja atingido em tempos da ordem de ps [37]. Em seguida, há desprendimento do material (elétrons, íons, radicais e átomos) na região em que ocorre a interação formando, portanto, uma pluma de plasma [37, 85].

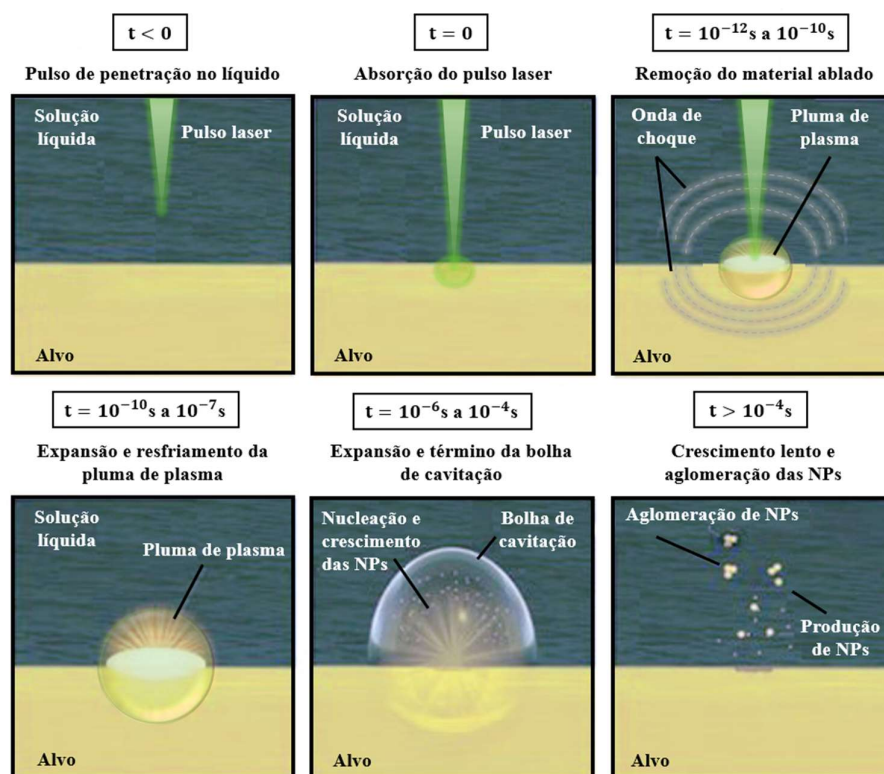


Figura 2.5 Esquema dos principais estágios da PLA em solução líquida. O processo do PLA se inicia com a absorção do pulso de laser pelo alvo formando uma pluma de plasma, contendo o material ablado, que se expande no líquido circundante, seguida pela emissão de uma onda de choque. Durante a expansão, a pluma de plasma esfria, liberando energia para a solução líquida, gerando, assim, uma bolha de cavitação que se expande no líquido e em seguir colapsa em uma escala de tempo da ordem de centenas de microssegundos, por meio da emissão de uma segunda onda de choque. Adaptada da referência [37].

A diferença da duração dos pulsos de laser e do tempo de relaxação elétron-fônon (da ordem de ps) influencia diretamente no processo de desprendimento do material [37, 77]. No caso dos pulsos ultracurtos, isto é, pulsos da ordem de femtossegundos (fs) e picosegundos (ps), a termalização elétron-fônon é alcançada em uma escala de tempo maior do que a duração do pulso, propiciando a predominância dos processos de absorção de multifótons e fotoionização [37, 38]. Nesse caso, a ablação é definida, genericamente, como fragmentação, onde o material ejetado é constituído de átomos quentes, vapores e gotas de líquido, ademais o desprendimento do material se dá de forma extremamente rápida e longe do equilíbrio termodinâmico [37]. No caso de um pulso com duração da ordem de ns (mesma duração de pulso utilizado no presente trabalho) o transporte de energia elétron-fônon pode ocorrer antes do final do

pulso do laser, possibilitando o uso da termodinâmica clássica para descrever a remoção de material [37, 86].

A cinética de evolução da pluma de plasma se dá de forma muito rápida (da ordem de 10^{-7} s), porque o aquecimento pelo pulso do laser alterna abruptamente com o resfriamento, devido à expansão da pluma e da troca de calor com o meio líquido [37]. A pressão do líquido é responsável pelo confinamento do plasma acima do alvo. A formação do plasma é seguida pela geração da onda de choque, portanto, quando o material é ejetado tem-se uma pressão de recuo deste material que pode gerar duas ondas de choque, isto é, uma onda de pressão que se propaga na direção do alvo e outra na direção do líquido a uma velocidade supersônica da ordem de 10^3 m/s [37]. Essa situação gera uma bolha denominada de bolha de cavitação. A propagação das ondas de choque, geradas pela ablação a laser, no alvo e no líquido, pode transportar entre 10% e 50% da energia do pulso, e, além disso, permite o desprendimento do material da região onde o laser atinge [37]. Posteriormente, a pluma de plasma se expande adiabaticamente aquecendo o líquido externo e formando eventuais novos materiais por interações químicas [37, 87, 88]. Vale ressaltar que existe uma parte do plasma (II) em que os íons e espécies excitadas provêm do metal (M), líquido (L) e dos gases (G), conforme ilustrado a Figura 2.4. O plasma formado durante a ablação em meio líquido é composto por espécies constituintes do alvo e das espécies constituintes do ambiente líquido utilizado, que poderá interagir entre si podendo levar a formação de hidróxidos e óxidos de metais [37].

Logo depois que o plasma é extinto e a energia térmica é transferida para o líquido, a bolha de cavitação é gerada com pressão interna menor do que a pressão externa causada pelo líquido, contribuindo para o colapso da bolha e emitindo a segunda onda de choque [37, 89, 90]. A duração total da bolha de cavitação estimada por Wagener et al. é da ordem de, aproximadamente, $350\mu\text{s}$ [91]. Ademais quando a bolha de cavitação colapsa surgem bolhas secundárias, denominadas microbolhas persistentes ou bolhas permanentes, com faixa de duração de milissegundos [92]. Essas microbolhas persistentes podem atuar como um escudo, absorvendo parte da energia do pulso do laser e interferindo na interação entre o pulso do laser e o alvo em PLA em solução líquida [38, 92, 93]. Kalus et al. identificaram a presença de H_2 , O_2 , H_2O_2 e N_2 , por meio da

cromatografia gasosa, no interior das microbolhas persistentes produzidas durante a ablação a laser pulsado utilizando vários metais de transição imersos em água [93]. Sendo assim, as microbolhas persistentes serão objetos essenciais para sustentar nossa proposta da reação de redução do CO₂, em que vamos denominar de CO₂RR, durante a PLA em solução líquida.

2.3.1 Parâmetros relacionados ao laser

O comprimento de onda utilizado para ablação a laser e a natureza do material ablado influenciam na distribuição do tamanho das nanopartículas produzidas [37]. As nanopartículas podem absorver o pulso laser e sofrer modificações durante a síntese, portanto, usar comprimentos de ondas que não sejam absorvidos pelos nanomateriais é preferível para evitar interação com os produtos [37]. No caso da síntese das nanopartículas de ouro por ablação a laser em meio líquido com pulsos de 532nm ou 355nm, ocorre a fotofragmentação propiciando a redução da distribuição do tamanho médio [37].

A energia utilizada na ablação está relacionada com a quantidade liberada de material. Além disso, quando a energia do pulso é aumentada a distribuição do tamanho médio das nanopartículas aumenta [37]. Foram observadas nanopartículas de ouro com distribuição maior de tamanho em alta fluência ($F > 100 \text{ J/cm}^2$), enquanto, em baixa fluência ($F < 100 \text{ J/cm}^2$) tem-se uma distribuição de tamanho menor [37]. Sendo assim, a variação na fluência do laser pode interferir no tamanho e na taxa de produção das nanopartículas, de modo que no caso dos pulsos de laser no regime de nanosegundos (ns , $10^{-9}s$) e com fluências mais baixas, o material alvo é removido, primordialmente, por evaporação e com a nucleação subsequente dos átomos vaporizados [94]. Entretanto, o aumento da fluência do laser faz com que uma grande quantidade de energia seja liberada para grande parte do alvo, propiciando a fusão e aumentando tanto o tamanho médio quanto a taxa de produção das nanopartículas [94]. Se, porventura, a fluência seja fixada e o diâmetro do pulso laser seja aumentado, teremos um aumento na taxa de produção das nanopartículas [37].

A variação na duração do pulso também influi na distribuição dos tamanhos das nanopartículas, além de contribuir para a estrutura e composição

dos nanomateriais [37]. O intervalo de tempo entre pulsos laser é determinado pela taxa de repetição. A taxa de produção de nanopartículas por unidade de tempo aumenta com a taxa de repetição. Porém, essa linearidade está atrelada ao fato da taxa de repetição ser maior do que o tempo de vida da bolha de cavitação, ou seja, inferior a $10^3 - 10^4$ Hz [37].

2.3.2 Parâmetros relacionados ao material

É de suma importância investigar os efeitos correlacionados a natureza do alvo e do líquido utilizado em relação a composição química do produto da PLA em solução líquida. Sendo assim, o uso de solventes e solutos são fundamentais para definir as características das nanopartículas ao final da síntese. O uso de solventes pode influenciar nas características das nanopartículas, tais como o tamanho e a composição [37]. Estudos reportam que a ablação a laser em água dos metais Au, Ag e Fe produzem nanopartículas formadas por metais e espécies oxidadas, enquanto ao utilizar solventes orgânicos como, por exemplo, tolueno, hexano e etanol, uma casca de carbono pode ser criada em torno das nanopartículas [37, 77].

Os solutos podem modificar as propriedades físico-químicas da solução líquida ou podem interagir diretamente com o material ablado [37]. A adição de solutos na ablação a laser em meio líquido permite aumentar o confinamento do plasma na superfície alvo, podendo controlar tanto a dimensão quanto a estabilidade das nanopartículas produzidas. Sendo assim, os solutos podem alterar a viscosidade e a densidade do solvente, e o aumento desses parâmetros melhora o confinamento da pluma de plasma e, conseqüentemente, corrobora para melhorar a eficiência da ablação [37]. O aumento da viscosidade do líquido e a presença de surfactantes ou agentes estabilizantes é geralmente utilizada para controlar e limitar a dimensão das nanopartículas, pois reduzem o tempo disponível para a interação e coalescência das nanopartículas [37, 95].

Sylvestre et al. observaram que as nanopartículas de ouro preparadas em soluções de NaOH eram menores do que aquelas produzidas em água deionizada, revelando que a carga superficial absoluta das nanopartículas de ouro, na qual aumenta com o pH (potencial hidrogeniônico), pode ter uma contribuição

determinante no controle do tamanho das partículas produzidas [96]. Sendo assim, as nanopartículas carregadas negativamente produzidas em solução básica tenderão a se repelir, limitando, portanto, a coalescência das partículas. Sylvestre et al. também observaram que as nanopartículas de ouro produzidas por ablação em NaCl e KCl foram menores do que as nanopartículas de ouro produzidas por ablação em água deionizada, para uma mesma fluência do laser [96].

2.3.3 Processo de produção do CO₂RR na PLA

O núcleo das nanopartículas sintetizadas por PLA em solução líquida tem sempre a composição do material alvo, todavia, a superfície das NPs é marcada pela presença grupos moleculares provenientes dos átomos presentes no ambiente em que ocorre a PLA. Na PLA dos alvos metálicos em água ou em solventes orgânicos pode ocorrer reações químicas entre os átomos das nanopartículas e os átomos ou moléculas dissociadas do solvente, nos quais podem formar grupos oxidados carregados na superfície das nanopartículas [96, 97], ou até mesmo uma casca de material de carbono, que por sua vez fornece estabilidade estérica [64]. Na Figura 2.6 temos um resumo dos diferentes tipos de composição superficial da dispersão coloidal obtidos por meio da PLA do alvo de ouro em água e diferentes solventes orgânicos [37].

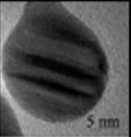
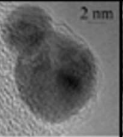
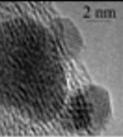
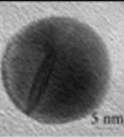
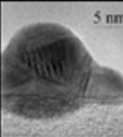
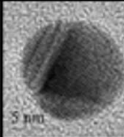
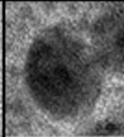
Alvo Solvente	Água <chem>H-O-H</chem>	Etanol <chem>CH3-CH2-OH</chem>	Acetonitrila <chem>CH3-C#N</chem>	Dimetil-formamida <chem>CN(C)C=O</chem>	Tetra-idrofurano <chem>C1CCOC1</chem>	Dimetil-sulfóxido <chem>CSC(=O)C</chem>	Tolueno <chem>Cc1ccccc1</chem>
Au							
	Metal Au	Metal Au	Metal Au	Metal Au	Metal Au	Metal Au	Metal Au / Grafite

Figura 2.6: Representação do resumo dos diferentes tipos de composição superficial da dispersão coloidal das nanopartículas de ouro em obtidos de PLA em água e em diferentes solventes orgânicos. Adaptado de [37].

De qualquer forma, a literatura sobre o processo de PLA em água de metais de transição, reporta a ausência de subprodutos secundários, e a presença de óxidos e hidróxidos na composição das NPs [98]. A única reação química

observada durante a PLA de metais de transição em água, é o processo de separação da molécula da água (WS, da acrossemia *water splitting*) [93]. Por conta das propriedades catalíticas das nanopartículas, as moléculas da água são “quebradas” em dois gases, H₂ e O₂, como mostra a equação química abaixo:



Kalus et al. verificaram que os gases hidrogênio e oxigênio produzidos no processo de separação da molécula de água são posteriormente transportados pelas bolhas permanentes geradas durante a PLA [93, 99].

O presente trabalho pretende demonstrar a síntese de diferentes espécies orgânicas durante o processo de PLA de alvos de ouro em água, devido ao processo de redução da CO₂, o qual vamos denominar de CO₂RR. Para obter CO₂RR na água são necessários: presença de prótons (H⁺) ou hidrogênio molecular (H₂) e elétrons (e⁻) capazes de atingir a superfície do catalisador [100], uma fonte de energia para equilibrar a variação da energia livre de Gibbs [101], um catalisador adequado para a ativação do CO₂ e, por fim, a estabilização dos produtos intermediários da reação [102]. As condições termodinâmicas extremas do ambiente próximo ao alvo metálico durante o PLA [77] são responsáveis pela decomposição da água com a presença de radicais altamente reativos ($\cdot\text{H}$, $\cdot\text{OH}$), H⁺, elétrons livres na solução e do H₂ molecular [77, 81, 93]. Todavia, não está claro qual é a fonte de energia fundamental envolvida nas reações catalíticas durante a PLA em água, mas, provavelmente, são desencadeadas simultaneamente por meio da liberação de energia através da radiação *Bremsstrahlung* [103], das ondas acústicas [93, 104] e da absorção direta do pulso do laser.

Sylvestre et al. verificaram que as nanopartículas, produzidas por ablação a laser em água, não são formadas exclusivamente de Au⁰ metálico, mas também contêm Au⁺ e Au³⁺ [96]. Os estados de oxidação do ouro são devidos, principalmente, aos compostos Au – O [96]. Tais compostos, provavelmente, resultam das reações químicas entre os átomos (ou íons) ou entre os aglomerados de Au ejetados e as espécies contendo oxigênio presentes no plasma gerado pelo laser ou na interface plasma/água [96]. Nos estudos de Sylvestre et al. foram detectados a presença de complexos de carbonato nas nanopartículas de ouro

(Au – OCO₂⁻ e Au – OCO₂H) e tal fato deve-se, provavelmente, à presença do CO₂ atmosférico [96].

A nossa hipótese para explicar a presença dos sub-produtos secundários detectados no presente trabalho, é a CO₂RR durante a PLA do alvo de metais de transição. O ouro policristalino é um metal tradicional usado para a CO₂RR eletroquímica seletiva para a CO [105] ou para a divisão de água (WS) [106]. Além disso, conforme relatado na literatura, as nanopartículas coloidais sintetizadas por PLA de alvo de ouro em água são caracterizadas por interfaces ouro/óxido de ouro (Au/AuO), o que pode potencialmente aumentar a estabilidade de produtos intermediários na superfície das nanopartículas para os processos WS e CO₂RR [107, 108]. Também não podemos excluir a possibilidade de formação de interfaces metal-semicondutor. De fato, embora o Au₂O₃ seja pouco estudado devido à sua instabilidade intrínseca [109, 110], o cálculo DFT *ab-initio* (do inglês, *Density Functional Theory*, DFT) prevê um *band gap* (BG) direto de cerca de 0,82eV para Au₂O [111].

Considerando este panorama, na Figura 2.7 propomos um modelo teórico simplificado das possíveis reações químicas envolvidas durante o processo CO₂RR induzido por PLA (PLA-CO₂RR). O mecanismo proposto, que leva à formação final dos materiais à base de carbono por PLA-CO₂RR, é uma sobreposição complexa de CO₂RR de uma e duas etapas, recentemente proposta como um processo em cascata para aumentar a eficiência faradáica na síntese de C₂ e C₃ produtos para processos industriais [112]. Como pode ser visto na Figura 2.7 (a), a reação de evolução de hidrogênio (HER) está em competição com CO₂RR de uma etapa, que classicamente leva ao monóxido de carbono (CO) e ácidos carboxílicos (R-COOH) como possíveis produtos principais. Teoricamente, o CO pode ser produzido tanto pela reação CO₂RR de uma etapa quanto pela reação de deslocamento reverso água-gás (RWGS) [113]. De fato, enquanto parte do CO pode complexar com a superfície do ouro, supomos que a outra parte pode ser transportada pelas bolhas permanentes, juntamente com os demais gases presentes no ambiente PLA, o CO₂ injetado e o H₂ e O₂ produzidos durante o processo WS. O CO pode ser ainda reduzido a álcoois e hidrocarbonetos pelo processo Fischer-Tropsch (FT) de CO presente nas bolhas permanentes, [114] finalizando um CO₂RR de duas etapas [113, 114], conforme relatado na Figura

2.7 (b). Como último passo em CO_2/C , supõe-se a redução adicional dos produtos FT a unidades de construção de C_n , que podem se condensar em formas sólidas de carbono, tanto ao redor dos nanorreatores metálicos quanto como nanoestruturas de carbono isoladas. A última proposta, é baseada nos resultados da literatura relatando a formação de nanoestruturas de carbono sp ou sp^2 por PLA de alvo Au em etanol, metanol [115], tolueno [116], hexano [117], ou por ablação direta de pequenos hidrocarbonetos como acetileno (C_2H_2), etileno (C_2H_4) ou benzeno (C_6H_6) [118], representando as unidades de construção C_n (unidades de carbono) mostradas em Figura 2.7 (b).

Identificou-se, via Espectroscopia Raman Amplificada pela Superfície (SERS, do inglês *Surface Enhanced Raman Scattering*), o ouro-carbonil caracterizado por uma estreita banda em 2124cm^{-1} [119]. Esse resultado pode ser o produto da reação da CO_2RR ou pode estar atrelada as cadeias lineares de carbono. O uso de absorvedores de CO_2 , como o NaOH, para ajustar o pH em valores neutros ou básicos cria condições químicas oportunas para a incorporação de AuNPs em uma casca estável rica em grupos hidroxila e carbonila, com traços de carbono amorfo e grafite [38, 119]. Sendo assim, a presença de CO adsorvido nas dispersões coloidais de AuNPs, pode ser responsável pela possível formação da ligação π -back no sistema metal-CO, o qual é responsável pelo aprimoramento químico da banda Raman característica do Au-carbonil [38, 119]. Esses resultados são bastantes interessantes para os estudos relacionados a nanomedicina. O desenvolvimento de moléculas com liberação controlada de monóxido de carbono (CORMs) como agentes farmacêuticos representa uma alternativa atraente e segura para a administração de CO gasoso, uma vez a que segurança e viabilidade do uso do CO como gás inalado permanece incerta devido à falta de especificidade e toxicidade em altas concentrações [41]. A maioria dos CORMs desenvolvidos até o momento são complexos de metal de transição e carbonila. Os estudos apontam que os CORMs apresentam propriedades anti-inflamatórias no tratamento da artrite, [42] infecção bacteriana [120] ou neuroinflamação [121], e, também, apresenta propriedades vasodilatadoras [122], capacidade de inibir a agregação plaquetária [123] e o efeito antiapoptótico [124]. Nessa perspectiva, o presente trabalho busca investigar uma possível ligação entre o efeito imunomodulador e os produtos secundários obtidos através da CO_2RR .

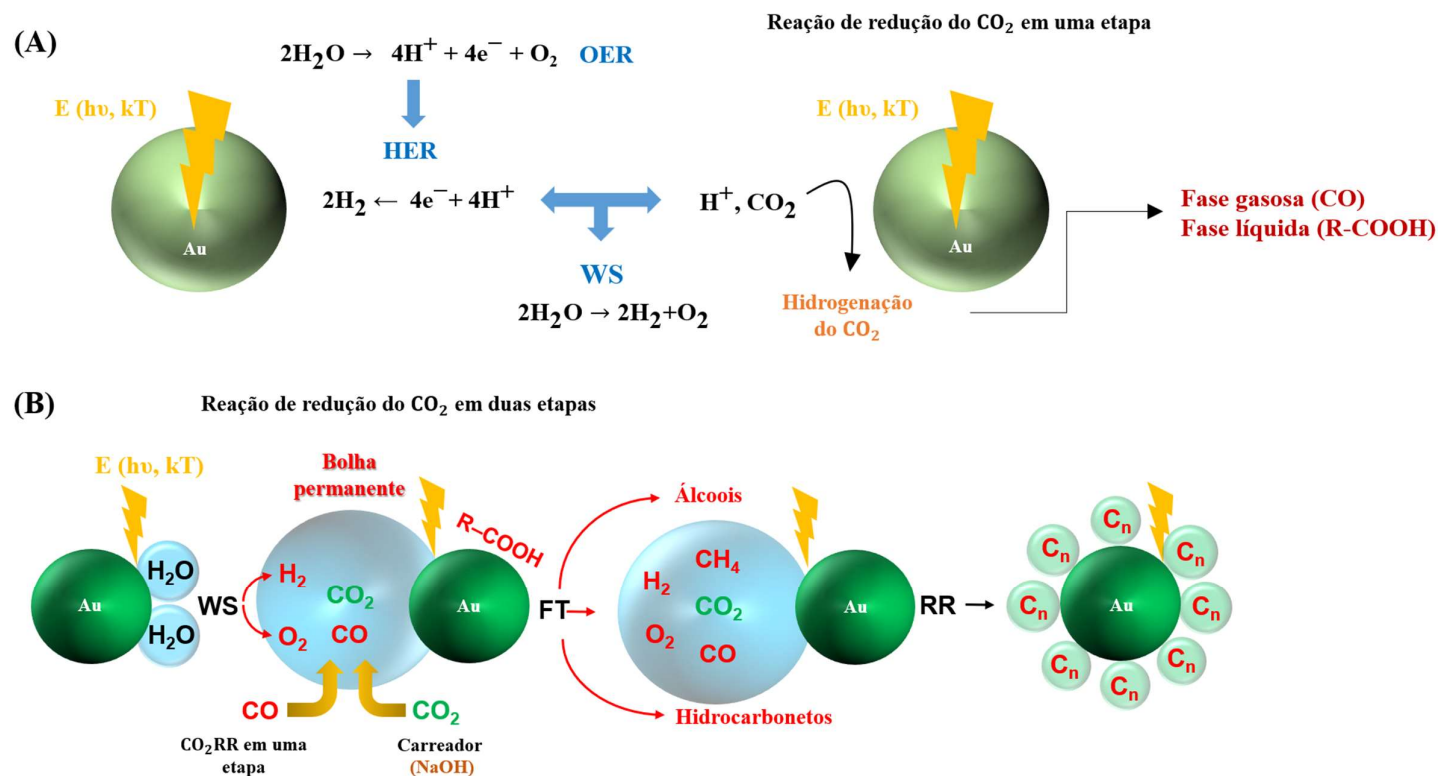


Figura 2.7: Esquema proposto dos processos físico-químicos envolvidos na redução de CO₂RR por nanorreatores de Au/AuO durante PLA de ouro. (A) WS de uma etapa e CO₂RR complementam-se, levando à formação de gases (H₂, O₂, CO) e possíveis ácidos carboxílicos (R-COOH). (B) A câmara de reação para o CO₂RR em duas etapas é constituída pelas bolhas permanentes produzidas durante o PLA, contendo CO₂, O₂, H₂ e CO obtidas durante o processo de redução em uma etapa. Após mais excitação, ocorre a hidrogenação direta do CO₂ pelo processo molecular H₂ e Fischer-Tropsch (FT), levando à produção de hidrocarbonetos e álcoois. Este último, pode sofrer ainda uma reação de redução catalítica (RR), que cria unidades de construção -C_n-, eventualmente condensando na forma de nano-material de carbono sólido. A energia de ativação E (hv, kT) pode ser dada tanto por rotas térmicas quanto ópticas.

2.4 Propriedades ópticas das nanopartículas de metais nobres

Antes dos cientistas iniciarem os estudos sobre as propriedades ópticas das nanoestruturas metálicas, elas foram empregadas por artistas para gerar cores vibrantes em cerâmicas e em vitrais das catedrais medievais [125, 126]. Um dos exemplos mais famosos é a taça de *Lycurgus* que remota ao Império Bizantino (século IV d.C.), Figura 2.8 [125]. A taça de *Lycurgus* é composta por nanopartículas de ouro e prata, e dependendo da posição da fonte da luz e do observador é possível verificar duas cores distintas da taça, isto é, se a taça for posicionada na frente de uma fonte de luz teremos a coloração verde (luz refletida), mas se a fonte de luz for posicionada no interior da taça, esta terá coloração vermelha (luz transmitida) [126, 127].



Figura 2.8: A taça *Lycurgus* iluminada por fora (esquerda) e por dentro (direita) [127].

O físico Michael Faraday verificou, em 1857, que a dispersão coloidal de ouro exibia coloração avermelhada, ocasionando, em primeira instância, estranheza já que a coloração natural do ouro é amarela [127, 128]. Os colóides foram obtidos pela redução de sais de ouro por fósforo branco, e essa foi, provavelmente, a primeira observação relatada sobre as propriedades ópticas dos colóides de ouro serem distintos daquelas do metal a granel [127]. Em 1908, o físico alemão Gustav Mie propôs uma solução analítica das equações de Maxwell para o espalhamento e absorção da onda eletromagnética de partículas com tamanho arbitrário, a fim de explicar as diferentes cores das dispersões coloidais de nanopartículas de um mesmo material mediante a diferença do tamanho dessas

nanopartículas [128] [129]. Tal fato, corroborou para uma série de estudos baseados no campo eletromagnético em superfícies com dimensão menor ou igual ao comprimento de onda, ou seja, estudos sobre a interação da luz com materiais metálicos em escala nanométrica [128, 130].

Esses estudos deram origem a Plasmônica, a qual constitui uma parte importante do campo da nanofotônica, em que se estuda a interação entre a radiação eletromagnética e os elétrons quase livres (elétrons de condução) em sistemas metálicos em uma interface metal/dielétrico [130, 131]. Assim, a plasmônica estuda como o campo eletromagnético pode ser confinado em dimensões da ordem ou menores que o comprimento de onda [128, 130]. A plasmônica tem como objeto de estudo os plasmons, no qual pode ser compreendido como excitações coletivas de elétrons condutores em metais, isto é, pequenos pacotes de energia (quanta ou fótons) que ocorrem mediante a oscilação da nuvem eletrônica do metal quando este é excitado por uma fonte de radiação externa [16]. Dessa forma, pode-se dizer que o metal é um importante componente da plasmônica, uma vez que este é o responsável pelos modos de propagação dos Plasmons de superfície (SP, do inglês *Surface Plasmons*). Os plasmons de superfície são oscilações de carga coletiva que ocorrem na interface entre condutores e dielétricos [16]. A nuvem eletrônica do metal apresenta uma frequência de oscilação própria e quando esta interage com a radiação eletromagnética com frequência idêntica há a Ressonância plasmônica [16]. Portanto, quando a oscilação dos plasmons de superfície é otimizada, isto é, quando ocorre a condição de ressonância, temos a Ressonância de plasmons de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmons Resonance*) [16].

Os plasmons de superfície são divididos em dois modos de excitação: Plasmon-polariton de superfície (SPP, do inglês *Surface Plasmon Polariton*) e Plasmon de superfície localizada (LSP, do inglês *Localized Surface Plasmon*). O Plasmon-polariton de superfície é obtido quando a onda eletromagnética incide em filmes metálicos e permanece confinada na superfície desse filme, isto é, quando as oscilações de elétrons coerentes são acopladas à radiação eletromagnética gera-se um modo eletromagnético que se propaga junto a interface metal/dielétrico [38, 128, 132]. A excitação depende da polarização da radiação incidente e da geometria da superfície do metal [38, 132]. O Plasmon-

polariton de superfície é extremamente útil para aplicações de sensoriamento [132]. O termo “polariton” foi proposto por Robert Fano para o acoplamento entre o fóton e uma excitação elementar do sólido [125]. Quando esse modo aceita a condição de ressonância recebe o nome de Ressonância de polariton-plasmon de superfície (SPPR, da acrossemia *Surface Plasmon Polariton Resonance*).

O plasmon de superfície localizada (LSP) ocorre quando se tem uma nanopartícula metálica com diâmetro muito menor que o comprimento de onda incidente. Nesse caso, o campo eletromagnético incidente exerce uma força uniforme sobre os elétrons de condução e os conduz em relação à carga positiva do núcleo estático em direção à superfície das nanopartículas [38, 132]. Como resultado do deslocamento das cargas são criados dipolos elétricos que geram um campo elétrico resultante dentro das nanopartículas oposto ao campo elétrico incidente, no qual irá fornecer uma força restauradora interna que fará com que os elétrons voltem para a posição de equilíbrio [130, 132], conforme mostra a Figura 2.9. A retirada do campo externo faz com que os elétrons oscilem com uma frequência natural denominada de frequência plasmônica e, quando a frequência da luz incidente coincide com a frequência plasmônica, a energia é acoplada no modo de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR, da acrossemia *Localized Surface Plasmon Resonance*) [38, 132] propiciando o aumento do campo ao redor da nanopartícula.

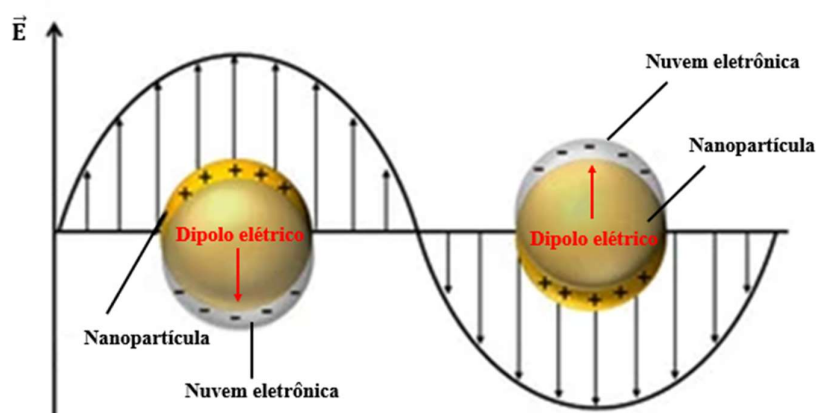


Figura 2.9: Esquema de plasmon de superfície localizada (LSP, da acrossemia Localized Surface Plasmon) de uma nanopartícula metálica. Adaptado de [126].

As nanopartículas de metais nobres como ouro e prata, apresentam banda LSPR na região visível do espectro eletromagnético [130]. Uma consequência disso são as cores brilhantes exibidas pelas nanopartículas tanto na luz transmitida quanto na refletida, devido ao aprimoramento ressonante de espalhamento e absorção [38, 130]. A eficiência de absorção das nanopartículas pode ser expressa, classicamente, em termos de seção de choque de absorção σ_{abs} , na qual pode ser definida como a seção geométrica de uma partícula opaca ideal que absorve o mesmo número de fótons que a partícula estudada. As nanopartículas também espalham a luz incidente, e nesse caso pode ser definida como uma seção transversal de espalhamento σ_{esp} . A soma da seção de choque de absorção com a seção transversal de espalhamento é denominada de seção de choque de extinção σ_{ext} . A seção de choque de extinção estima a fração de fótons que são absorvidos e espalhados do feixe incidente ao passar pelas nanopartículas [132].

O aumento do campo eletromagnético próximos a superfície está associado aos campos eletromagnéticos absorvidos e espalhados de modo que as nanopartículas metálicas apresentem seção transversal de absorção e espalhamento muito alta na ressonância, devido à presença de plasmons de superfície o que proporciona alto realce e alta sensibilidade na espectroscopia SERS e UV-Vis, respectivamente [38, 125]. O modo LSPR depende fortemente da composição, tamanho, geometria, ambiente dielétrico e distância de separação partícula-partícula das nanopartículas [132]. Para um estudo aprofundado do LSPR, é necessário resolver as equações de Maxwell para as nanopartículas metálicas sob condições de contorno e aproximação adequadas, o que por sua vez está fora do escopo desta dissertação. Para o presente estudo vamos considerar as características básicas dos fenômenos LSPR como a condição de Frölich, a qual pode ser obtida por meio da Aproximação quase-estática (QSA, da *acrossemia Quasi-Static Approximation*) e da Teoria de Mie.

2.4.1 Aproximação quase-estática (QSA)

Quando um campo eletromagnético interage com nanopartículas metálicas, pode-se gerar modos de dipolo, quadrupolo e octopolo em cada nanopartícula [38]. A principal contribuição para a absorção e espalhamento da luz pelas

nanopartículas metálicas se dá pelo modo dipolo quando o tamanho das nanopartículas for menor que o comprimento de onda (λ) da luz incidente ($d \ll \lambda$) [38, 130, 132]. Dessa forma, os campos eletromagnéticos harmonicamente oscilantes da onda incidente são aproximadamente uniformes dentro das nanopartículas, de modo que se pode calcular a distribuição espacial do campo assumindo o problema simplificado de uma partícula em um campo eletrostático [38, 130, 132]. Sendo assim, a interação de uma partícula de tamanho d com o campo eletromagnético pode ser analisada usando a aproximação quase-estática simples (QSA).

Para a solução analítica do problema vamos considerar uma partícula esférica homogênea e isotrópica de raio a e constante dielétrica complexa $\varepsilon(\omega)$, localizada na origem de um campo elétrico estático e uniforme $\vec{E} = E_0 \hat{z}$ [38, 130, 132]. O meio no qual a partícula esférica se encontra é isotrópico e não absorvente com constante dielétrica ε_m e as linhas de campo são paralelas a direção z , Figura 2.10 [38, 130, 132].

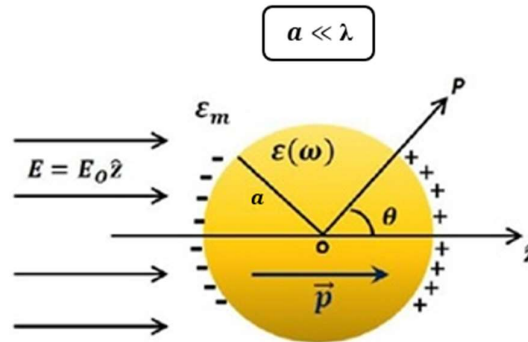


Figura 2.10: Diagrama esquemático de uma nanopartícula esférica de raio a , sob a excitação de um campo elétrico estático uniforme polarizado ao longo do eixo Z . Considerando o estudo da aproximação quase-estática simples (QSA) temos $a \ll \lambda$. Adaptado de [132].

Usando a aproximação quase-estática simples (QSA) a solução da equação de Laplace $\nabla^2 \Phi = 0$ para o potencial eletrostático $\vec{E} = -\nabla \Phi$ com condições de contorno em $r \rightarrow \infty$ e $r = a$, obtemos as seguintes equações:

$$\Phi_{\text{ext}} = -E_0 r \cos \theta + \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \frac{E_0 a^3 \cos \theta}{r^2} \quad [2-2]$$

e

$$\Phi_{\text{int}} = -\frac{3\varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} E_0 r \cos \theta \quad [2-3]$$

em que Φ_{ext} e Φ_{int} correspondem, respectivamente, ao potencial elétrico exterior e no interior da partícula esférica de raio a . Sabendo que r representa o módulo do vetor de posição e o ângulo θ é o ângulo entre o vetor r e o eixo z . Podemos reescrever Φ_{ext} em termos do momento de dipolo $\vec{p}$ como:

$$\Phi_{\text{ext}} = -E_0 r \cos \theta + \frac{\vec{p} \cdot \vec{r}}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_m(\omega) r^3} \quad [2-4]$$

sabendo que ε_0 é a permissividade elétrica no vácuo e $\vec{p}$ é o dipolo dielétrico induzido, no qual é proporcional ao campo aplicado $|\vec{E}_0|$ dentro da partícula esférica, sendo definido por:

$$\vec{p} = \varepsilon_0 \varepsilon_m(\omega) \alpha(\omega) \vec{E}_0 \quad [2-5]$$

em que a polarizabilidade α é dada por:

$$\alpha(\omega) = 4\pi a^3 \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \quad [2-6]$$

logo,

$$\vec{p} = 4\pi a^3 \varepsilon_0 \varepsilon_m(\omega) \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \vec{E}_0 \quad [2-7]$$

A equação acima representa a polarizabilidade complexa de uma pequena esfera metálica sob aproximação eletrostática [38, 130, 132] e mostra de forma explícita como a LSPR ocorre [133]. É notório que a polarizabilidade aumenta quando a parte real do denominador $\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)$ se anula, isto é

$$\text{Re}[\varepsilon(\omega)] = -2\varepsilon_m(\omega) \quad [2-8]$$

essa expressão é conhecida como condição de Frölich, e implica que $\text{Re}[\varepsilon(\omega)] < 0$ na ressonância [38, 130, 132]. Portanto, quando $\text{Re}[\varepsilon(\omega)] = -2\varepsilon_m(\omega)$ o denominador é igual a zero e a polarizabilidade tende a infinito, caracterizando,

assim, a condição de ressonância [133]. A seção transversal de espalhamento σ_{esp} e a seção de choque de absorção σ_{abs} correspondentes na aproximação quase-estática simples (QSA) são dadas por:

$$\sigma_{\text{esp}} = \frac{k^4}{6\pi} |\alpha(\omega)|^2 = \frac{8\pi}{3} k^4 a^6 \left| \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \right|^2 \quad [2-9]$$

e

$$\sigma_{\text{abs}} = k \text{Im}[\alpha(\omega)] = 4\pi k a^3 \text{Im} \left[\frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_m(\omega)}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m(\omega)} \right] \quad [2-10]$$

em que k é o vetor de onda. As equações acima mostram que σ_{esp} é proporcional a a^6 e σ_{abs} é proporcional a a^3 , em vista disso, quando as partículas são grandes a extinção é dominada pelo espalhamento, enquanto no caso de partículas pequenas está associada à absorção [38, 130, 132].

A condição de Fröhlich pode explicar o *red-shift* típico obtido nos espectros LSPR das dispersões coloidais de nanopartículas metálicas ao interagir com analitos externos, comumente usados como método de detecção em sensoriamento óptico LSPR [38, 130]. A aproximação quase-estática simples (QSA) fornece resultados precisos para nanopartículas esféricas pequenas ($r < 4$ nm), no entanto falha em descrever *red-shift* do LSPR com o diâmetro maior das nanopartículas, de modo que a modelagem correta das propriedades ópticas de uma dispersão coloidal real e polidispersa de nanopartículas precisa da abordagem de uma teoria eletromagnética mais rigorosa denominada de teoria de Mie [38, 134], que não é assunto da presente dissertação.

2.5 Raman

Essa técnica é usada para medir o deslocamento da frequência da luz espalhada quando um fóton incidente atinge a molécula da amostra e produz um fóton espalhado [135, 136]. No momento em que a luz do laser interage com as moléculas, os fótons são, instantaneamente, excitados para um estado eletrônico virtual e, concomitantemente, ao voltar ao estado de energia original emite um fóton com frequência idêntica a fonte de luz laser, esse fenômeno configura o

espalhamento elástico, no qual é denominado de espalhamento Rayleigh [136]. Todavia, uma fração de fótons pode retornar a um estado de energia menor ou maior do que o estado original, levando a um espalhamento inelástico, no qual a frequência do fóton espalhado é distinta da frequência do fóton original [136]. Para o caso em que o fóton espalhado tenha frequência menor que o fóton original temos o espalhamento Raman Stokes, mas para o caso em que o fóton espalhado tenha uma energia maior do que o fóton original, temos o espalhamento Raman Anti-Stokes [136]. A Figura 2.11 elucida o espalhamento Rayleigh e Raman.

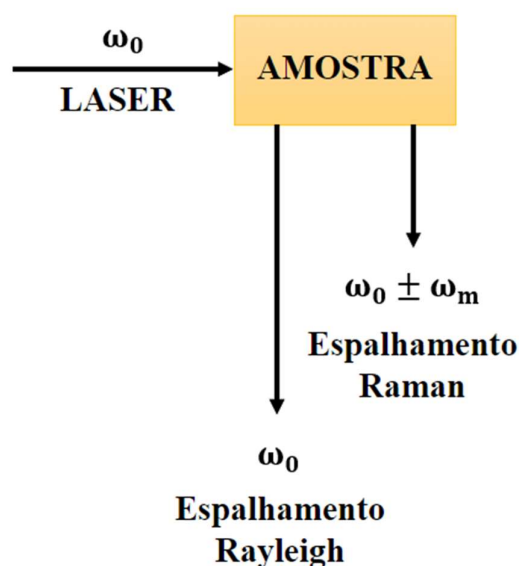


Figura 2.11: Esquema do espalhamento Rayleigh e Raman. Adaptado de [136].

Tomando a abordagem clássica, em que a luz monocromática é tratada como uma onda eletromagnética, a descrição do espalhamento Raman considera que a molécula de espalhamento se comporta como uma coleção de átomos passando por vibrações harmônicas simples, não considerando, portanto, a quantização da energia vibracional [137]. Dessa forma, quando uma molécula é colocada em um campo elétrico, os elétrons são deslocados em relação ao núcleo desenvolvendo, portanto, um momento de dipolo elétrico [38, 39, 137, 138]. No caso de pequenos campos, o momento dipolo induzido ($\vec{P}$) é proporcional a intensidade do campo ($\vec{E}$), logo, podemos escrever,

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad [2-11]$$

em que α é a constante de proporcionalidade, no qual se refere a polarizabilidade eletrônica, e o $\vec{E}$ é o campo elétrico, sendo igual a:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad [2-12]$$

no qual $\vec{E}_0$ é a intensidade do campo em equilíbrio e ω_0 é a frequência angular da radiação eletromagnética (feixe laser). Logo,

$$\vec{P} = \alpha \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad [2-13]$$

Sabendo que o termo α pode ser expandido em termos de modos normais de vibração, então, se a polarizabilidade eletrônica mudar durante a vibração da molécula podemos escrevê-la, usando a série de Taylor, como:

$$\alpha = (\alpha_{k,l})_0 + \sum_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_m + \frac{1}{2} \sum_{m,n} \frac{\partial^2 \alpha_{k,l}}{\partial Q_m \partial Q_n} Q_m Q_n + \dots \quad [2-14]$$

no qual $\alpha_{k,l}$ é uma componente do tensor de polarizabilidade e a representação $(\alpha_{k,l})_0$ denota essa componente na configuração de equilíbrio. A fim de simplificar, podemos adotar vibrações com pequena amplitude vibracional e desprezar os termos de ordens superiores de Q [137, 139]. Assim, pode-se reescrever a equação [2-14] da seguinte forma:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_m \quad [2-15]$$

de modo que α_0 corresponde a polarização na posição de equilíbrio, o termo $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0$ é a taxa de variação de Q_m na posição de equilíbrio e Q_m denota ao modo normal de vibração que oscila com frequência ω_m . As vibrações normais são tratadas como harmônicas, portanto, o modo normal de vibração Q_m é dado por:

$$Q_m = Q_{m_0} \cos(\omega_m t + \delta_m) \quad [2-16]$$

em que δ_m representa um fator arbitrário de fase. Combinando as equações [2-13] com [2-15], teremos:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_m \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad [2-17]$$

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_{m_0} \cos(\omega_m t + \delta_m) \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad [2-18]$$

arrumando os termos,

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_{m_0} \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \cos(\omega_m t + \delta_m) \quad [2-19]$$

usando a identidade trigonométrica $\cos(\theta) \cos(\varphi) = \frac{1}{2}(\cos(\theta - \varphi) + \cos(\theta + \varphi))$, obtemos,

$$\begin{aligned} \vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_{m_0} \vec{E}_0 [\cos(\omega_0 t - (\omega_m t + \delta_m)) + \\ + \cos(\omega_0 t + (\omega_m t + \delta_m))] \end{aligned} \quad [2-20]$$

$$\begin{aligned} \vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0 Q_{m_0} \vec{E}_0 [\cos((\omega_0 - \omega_m)t - \delta_m) + \\ + \cos((\omega_0 + \omega_m)t + \delta_m)] \end{aligned} \quad [2-21]$$

ou ainda,

$$\vec{P} = \vec{P}(\omega_0) + \vec{P}(\omega_0 - \omega_m) + \vec{P}(\omega_0 + \omega_m) \quad [2-22]$$

em que o primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh, o segundo termo destina-se ao espalhamento Raman Stokes e o terceiro termo ao espalhamento Raman Anti-Stokes. Além disso, a parte $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_m} \right) \bigg|_0$ da equação deve ser diferente de zero para que ocorra o espalhamento Raman, ou seja, a polarização da molécula deve mudar durante a vibração [136-138]. A Figura 2.12, mostra um diagrama de energia eletrônica de uma molécula no espalhamento Rayleigh e no espalhamento Raman.

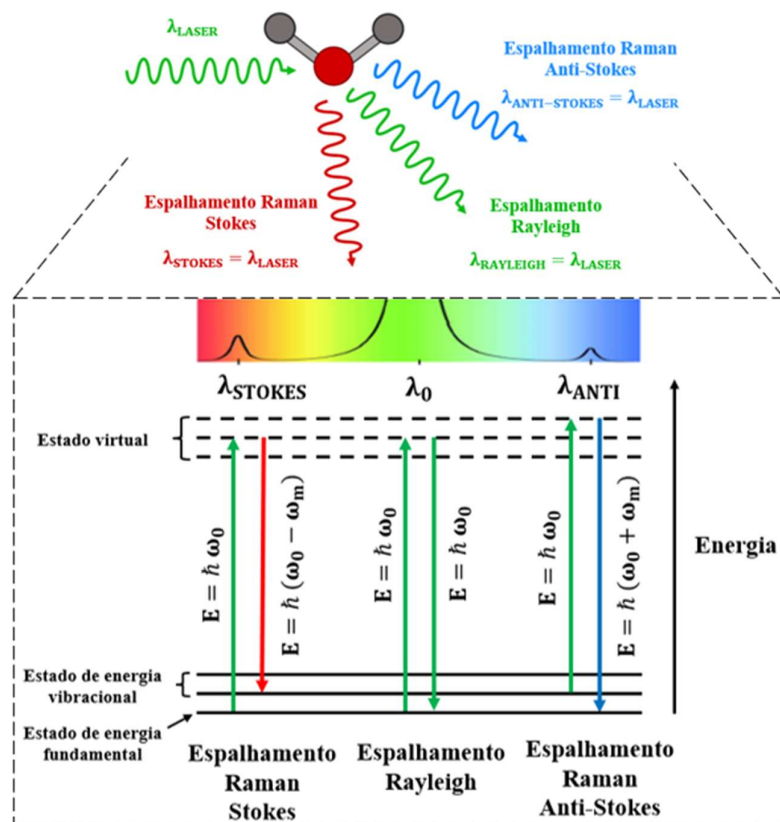


Figura 2.12: Diagrama de energia eletrônica de uma molécula. No espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico) temos a conservação da frequência ω_0 . No espalhamento Raman (inelástico), a componente $(\omega_0 - \omega_m)$ é responsável pelo shift em direção ao vermelho, tendo, portanto, o espalhamento Raman Stokes. Porém, a componente $(\omega_0 + \omega_m)$ é responsável pelo shift em direção ao azul, que, por sua vez, está relacionada ao espalhamento Raman Anti-Stokes. Adaptado de [140].

Sendo assim, a teoria clássica descreve com sucesso as relações de frequência do espalhamento vibracional Raman e mostra que o deslocamento Raman é independente da frequência da radiação incidente [138]. Portanto, se excitamos uma molécula com o laser verde ou azul vamos obter o mesmo perfil espectral dos deslocamentos do espalhamento Raman característicos da molécula analisada, porém, não necessariamente terão a mesma intensidade relativa [138]. Em vista disso, a mudança no comprimento de onda da luz laser espalhada é responsável por fornecer as informações sobre a química molecular da amostra que é objeto de estudo, logo, o espectro Raman pode ser tratado como uma ferramenta de impressão digital [135]. O sinal Raman pode ser formalmente expresso a partir da seguinte expressão:

$$P_{\text{RAMAN}} = KNI\sigma_K \quad [2-23]$$

em que P_{RAMAN} é a potência óptica lida pelo detector, N representa o número de moléculas iluminadas, I é a intensidade do laser, e σ_K corresponde à seção de choque diferencial do k -ésimo modo normal de vibração. O termo K refere-se a uma constante de proporcionalidade relacionada a fração de fóton emitidos pela amostra e convertidas em elétrons pelo detector [141]. Diante do que foi mencionado, pode-se concluir que a espectroscopia Raman é uma ferramenta fundamental para a compreensão da natureza química das nanopartículas e identificação de possíveis produtos orgânicos obtido durante a síntese via PLA.

2.5.1 Espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS)

O espalhamento Raman pode ser amplificado colocando-se a amostra sobre a superfície de substratos nano estruturados. Nesse caso, tem-se a espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS, do inglês *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) que apresenta maior sensibilidade para detecção estrutural de analitos com baixa concentração [135, 142]. Em geral, usa-se como base para a preparação do substrato, metais com alta refletividade óptica, tal como: Au, Ag e Cu [143]. O aprimoramento do espalhamento Raman pelo efeito SERS tipicamente é da ordem de 10^6 , todavia pode chegar a intensificações de 10^{14} , podendo detectar uma única molécula [143, 144]. O efeito SERS pode ser compreendido por dois mecanismos: eletromagnético e químico [143, 145].

A amplificação do espalhamento Raman no que tange ao mecanismo eletromagnético, se deve ao fato do campo eletromagnético na superfície do metal ser alterado em relação ao campo elétrico incidente, de tal modo que a excitação da luz na superfície do metal faça com que os elétrons de condução presentes nas últimas camadas eletrônicas oscilem de maneira coletiva, propiciando a Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*). Isso corrobora para que o campo eletromagnético da partícula aumente significativamente a partir do campo elétrico aplicado [135, 136, 142, 145]. Em contrapartida, o mecanismo químico está associado a formação de um complexo de transferência de carga entre a superfície do metal

que compõem o substrato e o analito [143]. Em geral, a contribuição do mecanismo químico para o efeito SERS é da ordem de 10^2 [143]. Dessa forma, o sinal SERS pode ser expresso da seguinte forma:

$$P_{\text{SERS}} = G_{\text{SERS}} P_{\text{RAMAN}} \quad [2-24]$$

dado que P_{RAMAN} é a potência óptica lida pelo detector e G_{SERS} denomina-se o fator de realce SERS, sendo o responsável pela amplificação do sinal Raman. Sabendo que o aprimoramento total do SERS (G_{SERS}) pode ser expresso como o produto das contribuições eletromagnética ($G_{\text{SERS}}^{\text{EM}}$) e química ($G_{\text{SERS}}^{\text{QUÍM}}$), isto é:

$$G_{\text{SERS}} = G_{\text{SERS}}^{\text{EM}} G_{\text{SERS}}^{\text{QUÍM}} \quad [2-25]$$

Portanto, podemos escrever a equação como:

$$P_{\text{SERS}} = G_{\text{SERS}}^{\text{EM}} G_{\text{SERS}}^{\text{QUÍM}} P_{\text{RAMAN}} \quad [2-26]$$

Sabendo que P_{RAMAN} é dado pela equação [2-23], a intensificação do sinal SERS pode ser escrita como:

$$P_{\text{SERS}}(\omega_S) = K N I(\omega_L) \sigma_K^{\text{MeNP}} |A(\omega_S)|^2 |A(\omega_L)|^2 \quad [2-27]$$

em que $A(\omega_S)$ e $A(\omega_L)$ correspondem, respectivamente, aos fatores de intensificação do campo eletromagnético ao redor da nanopartícula metálica no comprimento de onda espalhado (ω_S) e absorvido (ω_L). N representa o número de moléculas envolvidas e $I(\omega_L)$ a intensidade do laser. O termo σ_K^{MeNP} indica a seção de choque Raman dos analitos em contato com a superfície metálica do substrato. A interação do analito com o substrato metálico modifica a estrutura da molécula e, conseqüentemente, a seção de choque, portanto, a contribuição química se deve primordialmente ao aumento da seção de choque Raman [144]. A Figura 2.13 exemplifica de forma esquemática o princípio básico da espectroscopia SERS, mostrando uma nanoestrutura do metal nobre em forma de

aglomerados de nanopartículas, os quais podem ser obtidos por meio da deposição de gotas da nanopartícula sob um substrato.

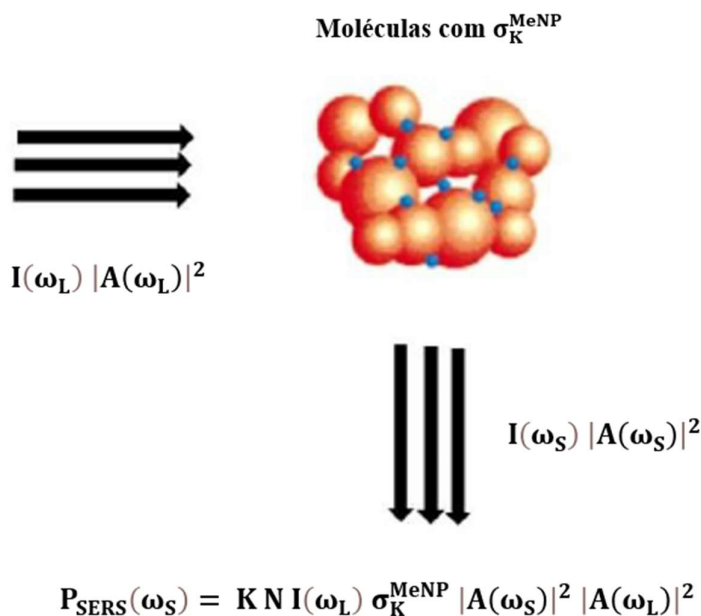


Figura 2.13: Resumo esquemático do princípio da espectroscopia SERS. A intensidade de entrada e espalhada são amplificadas pelo fator $|A(\omega_S)|^2 |A(\omega_L)|^2$. Adaptado de [38].

A espectroscopia SERS foi utilizada para o estudo da natureza química das nanopartículas e a identificação do produto secundário orgânico (ácidos carboxílicos) possivelmente provenientes da síntese por PLA.

2.6 Aplicação do ouro e das nanopartículas de ouro na medicina

O uso medicinal do ouro (Au) remonta aos tempos antigos, com médicos orientais prescrevendo preparações de Au para o tratamento de várias doenças [24]. Os sais de ouro eram recomendados pelos alquimistas como remédio para todos os males, sendo conhecido como “elixir da vida” [24, 146]. No início da Renascença, o ouro era recomendado para purificar o sangue e acreditava-se que tinha inúmeras virtudes médicas [146]. Em 1890, o bacteriologista alemão Robert Koch descobriu que baixas concentrações do dicianoaurato de potássio ($K[Au(CN)_2]$) apresentavam propriedades antibacterianas contra o bacilo da tuberculose [146]. A partir de então, os estudos relacionados a aplicação do ouro

na medicina tomaram grande proporção. Nessa perspectiva, surgiram diversas medicações, tal como os sais de ouro [24]. Jacques Forestier observou o potencial anti-inflamatório dos sais de ouro no tratamento da artrite reumatóide, na qual se trata de uma doença autoimune crônica e sem cura aparente [24]. Todavia os efeitos adversos desses medicamentos contribuíram para estudos de tratamentos alternativos.

Nesse contexto, a Nanomedicina surgiu como campo essencial para o estudo de terapias não convencionais [16, 24]. Diante dessa conjuntura, as nanopartículas de ouro emergem com grande potencial para geração de imagens, terapias fotodinâmica e térmica para cura do câncer, ou entrega de drogas [18, 17]. Além disso, as nanopartículas de ouro, também, podem ser empregadas no âmbito da teranóstica, isto é, podem apresentar funções diagnósticas e terapêuticas de modo simultâneo, de tal forma que a nanopartícula pode ser física e quimicamente adaptada para um determinado órgão, doença ou paciente [16].

A atenção em especial as nanopartículas de ouro se devem ao fato delas apresentarem alta estabilidade térmica e baixa volatilidade, baixa citotoxicidade, não serem imunogênicas, serem funcionalizáveis e devido a propriedade plasmônica [16, 26-28]. Um outro fator importante é a química de superfície versátil das nanopartículas de ouro, na qual permite que sejam revestidas com polímeros e moléculas de reconhecimento biológico [24]. Dessa forma, as nanopartículas de ouro podem ser entregues precisamente às células cancerígenas alvo por deposição passiva em tecido tumoral permeável ou ser direcionado ao tecido canceroso por biomarcadores específicos, possibilitando o aumento da eficácia na radioterapia, por exemplo [24].

Estudos apontam que as nanopartículas de ouro apresentam grande potencial no tratamento de doenças reumáticas atribuídas a ações anti-inflamatórias e antiangiogênicas [24]. No entanto, apesar do potencial terapêutico das nanopartículas de ouro são necessários mais estudos, uma vez que a segurança dessas nanopartículas continua sendo uma preocupação para os humanos, pois o equilíbrio entre as propriedades terapêuticas e a presença de efeitos adversos ainda não está bem estabelecido na literatura [24].

2.7 Inflamação

A inflamação pode ser definida como um processo complexo que ocorre mediante a fatores tanto exógenos quanto endógenos, visando assegurar a homeostase e o mecanismo de defesa do organismo [147, 148]. A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência dos seres vivos, uma vez que possibilita a eliminação de agentes estranhos ao hospedeiro e o reparo tecidual da área afetada [147, 148]. Um dos primeiros registros históricos do processo inflamatório, ocorreu na Roma Antiga por Aurélio Cornélio Celso, no qual, definiu o processo inflamatório, embasado em quatro sinais característicos, denominados de sinais cardinais da inflamação, sendo eles: dor, rubor, edema e calor [147]. O patologista alemão, Rudolf Virchow, identificou, em 1858, o quinto sinal cardinal da inflamação, no qual está atribuído à perda de função [147].

No processo inflamatório mais sangue é fornecido à região danificada, proporcionando a vasodilatação, que tem como consequência o calor e o rubor (vermelhidão). Nessa região, também, ocorre o aumento da permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento vascular de fluidos, proteínas e a infiltração de células fagocitárias, ocasionando, assim, o edema. Dessa forma, surge a dor, que está correlacionada tanto com as substâncias químicas envolvidas na inflamação, bem como no próprio edema que comprime as terminações nervosas local, por conseguinte, há perda de função na região afetada [147, 149].

A resposta inflamatória é uma reação natural do organismo, ocasionada por uma variedade de estímulos, incluindo: patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e respostas autoimunes. Essa resposta é mediada pela função imunológica, na qual é dividida, conceitualmente, em imunidade inata e imunidade adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa diante de qualquer material estranho, enquanto a imunidade adaptativa é caracterizada por empregar mecanismos mais sofisticados e específicos, atuar na eliminação de patógenos na fase tardia e na geração de memória imunológica [25, 150]. Dessa forma, pode-se dizer que, a inflamação é uma sequência de eventos bem ordenada mediada, primordialmente, por células imunes inatas ativadas [149]. Em geral, a resposta inflamatória é iniciada em poucos minutos diante da presença de um estímulo estranho ao hospedeiro, iniciando-se, assim, um influxo maciço de

células imunes como neutrófilos, linfócitos, monócitos (precursores sanguíneos dos macrófagos), células dendríticas e células *Natural Killer* - NK [25, 150].

As respostas imunes inatas estão embasadas na habilidade de reconhecimentos dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), os quais estão correlacionados a proteínas, lipídeos ou ácidos nucleicos dos patógenos. Os PAMPs ativam a resposta imune inata, por meio da interação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo os receptores da família *Toll-like* (TLRs) [150]. Em geral, os receptores TLRs estão presentes em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Quando os PRRs são ativados proporcionam a produção de uma grande quantidade de moléculas sinalizadoras lipídicas (prostaglandinas), bem como as moléculas sinalizadoras proteicas (citocinas), nas quais medeiam a resposta inflamatória na região afetada [150].

Portanto, quando a inflamação é desencadeada por um patógeno os macrófagos residentes na região afetada são estimulados por PRRs, tal como os receptores TLRs, podendo reconhecer estruturas moleculares de patógenos microbianos. As respostas mediadas pelos receptores TLRs, por sua vez, levam à ativação de uma vasta gama de citocinas pró-inflamatórias, incluindo várias interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e quimiocinas [149, 150]. Na Tabela 2.2, encontra-se algumas das principais citocinas envolvidas na inflamação.

Esse conjunto de moléculas coestimuladoras recrutam células efetoras, como leucócitos (monócitos e neutrófilos), para o local afetado afim de realizarem a fagocitose do patógeno. As citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF- α , proporcionam o aumento da expressão de moléculas de adesão (selectinas) dos neutrófilos circulantes, mas como a adesão é fraca ocorre o rolamento da célula pelo endotélio vascular, em sequência, ocorre o processo de adesão forte ao endotélio, por intermédio de integrinas, possibilitando a transmigração para o sítio inflamatório, conforme mostra a Figura 2.14.

Tabela 2.2: Citocinas envolvidas na inflamação e suas funções

Citocinas	Fonte celular	Função
IL-1	Macrófagos, monócitos	Pró-inflamatório, proliferação, apoptose, diferenciação
IL-6	Macrófagos, células-T	Pró-inflamatório, diferenciação, produção de citocinas
IL-4	Células-Th	Anti-inflamatória
IL-8	Macrófagos, células epiteliais, células endoteliais	Pró-inflamatório, angiogêneses, quimiotaxia
IL-10	Macrófagos, células-T	Anti-inflamatória, inibição das citocinas pró-inflamatórias
IL-11	Fibroblastos, células epiteliais, neurônios	Anti-inflamatória, diferenciação
IL-12	Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas	Pró-inflamatório, diferenciação, ativação das células <i>Natural Killer</i> -NK
TNF- α	Macrófagos, células <i>Natural Killer</i> -NK	Pró-inflamatório, produção de citocinas, proliferação celular, apoptose, anti-infecção
TGF- β	Macrófagos, células-T	Anti-inflamatório, inibição da produção de citocinas pró-inflamatória
IFN- γ	Células-T, células <i>Natural Killer</i> -NK	Pró-inflamatório, imunidade adaptativa antiviral

Adaptado de [34].

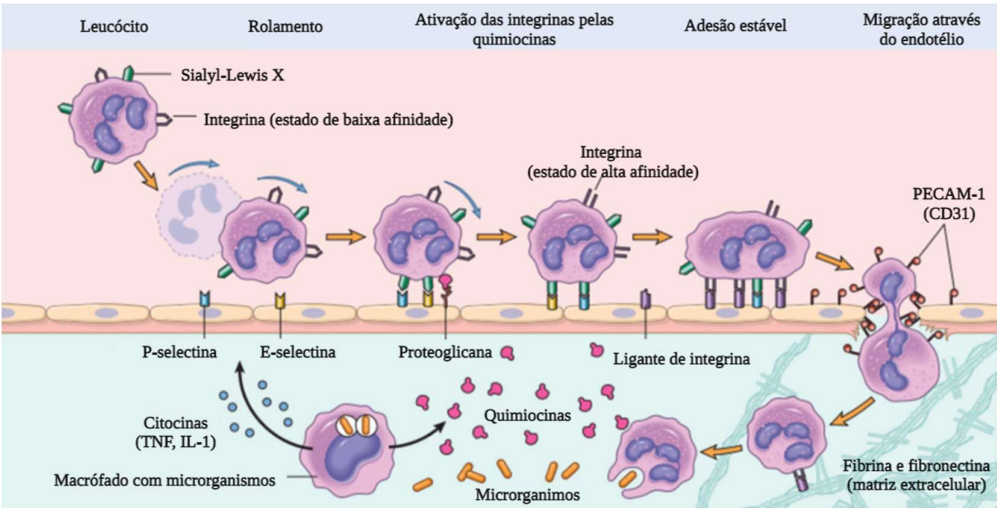


Figura 2.14: Representação esquemática das etapas de migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos durante a resposta inflamatória. Os leucócitos (no esquema são mostrados os neutrófilos) primeiro rolam, em seguida são ativados e aderem ao endotélio, posteriormente transmigram através do endotélio rompendo a membrana basal e migrando em direção aos quimiocinas que emanam da fonte da lesão. Em que Sialyl-LewisX (sLex) é um glicano envolvido no extravasamento via ligação de selectina e PECAM-1 é uma molécula de adesão celular endotelial plaquetária. Adaptado de [148].

Nas primeiras 24h, tem-se a predominância dos neutrófilos, posteriormente a emigração dos neutrófilos diminui, enquanto a entrada de monócitos para o sítio inflamatório aumenta [151]. A migração dessas células circulantes na corrente sanguínea para os tecidos é conhecida como diapedese, e quando o monócito migra da corrente sanguínea para o tecido sofre diferenciação originando o macrófago.

O processo de fagocitose, ocorre por meio da ligação do patógenos aos receptores de superfícies celular presentes em macrófagos e neutrófilos (Figura 2.15). Quando o patógeno é fagocitado, ele é internalizado em vesículas denominadas de fagolisossomos [150]. As células fagocíticas, como os macrófagos, criam complexos enzimáticos lisossomais como *NADPH-oxidase* (NADPH, nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-hidrogênio) na membrana do fagolisossomo, com finalidade de catalisar, isto é, estimular a produção de espécies reativas a oxigênio (EROs), tal como: ânion superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila. Um aumento transitório no consumo de oxigênio pelas células fagocíticas propicia um desequilíbrio na produção de EROs gerando o estresse oxidativo. Em paralelo, também há superprodução de NO causando um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas a nitrogênio (ERNs) e o consumo dela. A combinação dos radicais O_2^- e NO, forma o peroxinitrito ($ONOO^-$) [148, 152].



O peroxinitrito ($ONOO^-$) é um produto extremamente citotóxico, cuja finalidade é matar o patógeno invasor. Esses mecanismos são os principais contribuintes para danos colaterais ao hospedeiro, uma vez que o efeito final dessas interações culmina nos sinais cardinais da inflamação [153].

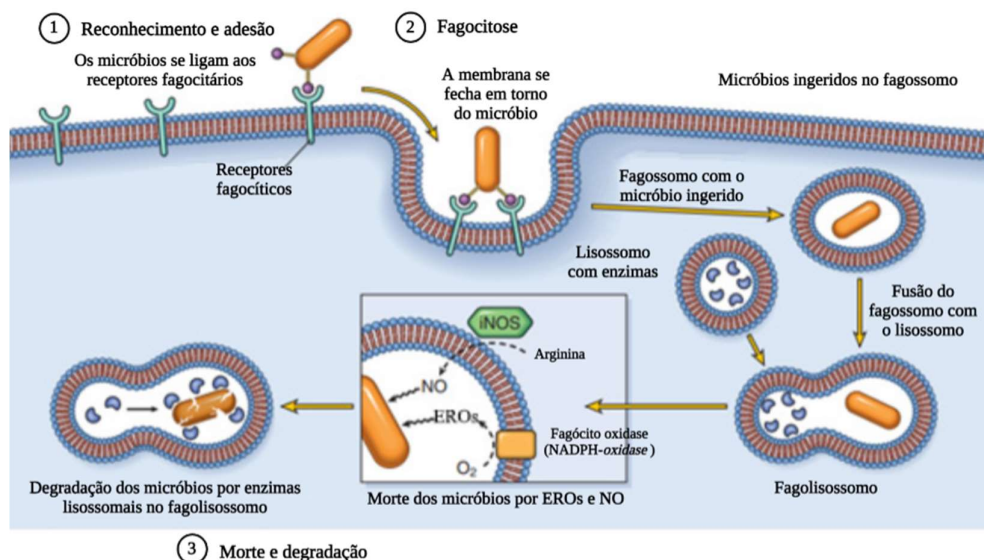


Figura 2.15: Representação esquemática da fagocitose de um patógeno. (1) A fagocitose de um patógeno envolve a fixação e a ligação da partícula a receptores na superfície leucocitária. (2) Fase relacionada ao englobamento e fusão do vacúolo fagocítico com grânulos (lisossomos). (3) Etapa correspondente a destruição do patógeno ingerida. Sabendo que iNOS corresponde a sintase de óxido nítrico induzível, NO é o óxido nítrico e EROs são as espécies reativas de oxigênio. Adaptado de [148].

Entretanto, o peroxinitrito (ONOO^-) além de matar os patógenos, também podem matar o próprio macrófago e ocasionar a destruição tissular, portanto, a última etapa da resposta inflamatória consiste no processo de resolução da inflamação [153]. Nessa etapa, ocorre o reparo do tecido lesionado e a redução da produção de mediadores pró-inflamatórios por meio do processo de apoptose dos neutrófilos ativados durante o processo inflamatório [153]. Os macrófagos realizam fagocitose desses neutrófilos apoptóticos e passam a produzir lipoxinas, que, por sua vez, bloqueiam o recrutamento de neutrófilos, além de favorecer a infiltração de monócitos importantes para a cicatrização de feridas [153]. Na literatura, também é reportada a participação das citocinas anti-inflamatórias tais como $\text{TGF-}\beta$ e IL-10 como agentes de regulação da resposta inflamatória. A Tabela 2.2, apresenta alguns exemplos de citocinas anti-inflamatórias envolvidas no processo inflamatório. Dessa forma, pode-se dizer que os macrófagos são células que desempenham um papel fundamental na inflamação [34, 149].

Nessa perspectiva, a ativação das células imunes, como os macrófagos, é desejada em várias condições, todavia, uma resposta imune excessiva pode promover lesões teciduais severas e, até mesmo, a imunossupressão. Assim, a

inflamação pode ser classificada como inflamação aguda e inflamação crônica. A inflamação aguda se trata de uma resposta protetora de caráter fisiológico do organismo a fim de neutralizar e eliminar o patógeno, além de agir no reparo tecidual (dos tecidos danificados por fibrose) e bloquear a resposta inflamatória. Em contrapartida, quando há uma falha no processo de resolução da resposta inflamatória, a resposta tecidual progride gradualmente para a inflamação crônica. A inflamação crônica se transforma em um distúrbio autoimune no qual ataca as células saudáveis, resultando em uma doença, tal como aterosclerose, diabetes tipo 2, artrite reumatoide e o câncer [25, 147].

2.7.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas a nitrogênio (ERNs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são um tipo de radical livre derivado do oxigênio. Entende-se por radicais livres espécies químicas instáveis que apresentam um único elétron desemparelhado em um orbital externo e que reagem prontamente com produtos químicos inorgânicos e orgânicos [148]. Normalmente, as EROs são produzidas em pequenas quantidades em todas as células durante as reações de redução-oxidação (redox) que ocorrem durante a respiração mitocondrial e geração de energia. As EROs produzidas pelos macrófagos e neutrófilos tem caráter tóxico, a fim de destruir o patógeno fagocitado, e, nesse caso, são geradas no fagolisossomos por meio de um processo chamado de explosão oxidativa [148]. Nesse caso, as EROs são sintetizadas por meio da *NADPH-oxidase* e liberados pelos macrófagos quando ativados por um estímulo inflamatório. A *NADPH-oxidase*, oxida o NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzido) e, no processo, converte oxigênio em íon superóxido (O_2^-). Em seguida, o superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio, conforme a reação química [2-29].



Sendo assim, quando as EROs são secretadas em níveis baixos, podem aumentar a expressão de quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão,

amplificando quantidade de mediadores inflamatórios [148]. Porém, em níveis mais elevados, as EROs são responsáveis pela lesão tecidual. Portanto, o dano causado pelos radicais livres é determinado por suas taxas de produção e remoção, ou seja, quando a produção de EROs aumenta ou os sistemas de eliminação são ineficazes, o resultado é um excesso desses radicais livres, levando a uma condição chamada estresse oxidativo [148].

O óxido nítrico (NO) também é um radical livre, e, portanto, reage rapidamente com diversos compostos, primordialmente, com espécies contendo elétrons desemparelhados, tal como o oxigênio molecular [154]. O NO é uma molécula gasosa de curta meia vida, mas que é capaz de mediar diversas funções no organismo humano, como, por exemplo, proporcionar a dilatação do endotélio vascular. As células macrófagos usam o NO como agente citotóxico, a fim de destruir patógenos e células tumorais [148]. A síntese endógena do NO ocorre na conversão do aminoácido L-arginina a NO e L-citrullina, por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Na Figura 2.16, alguns exemplos de fontes endógenas e exógenas do estresse oxidativo.

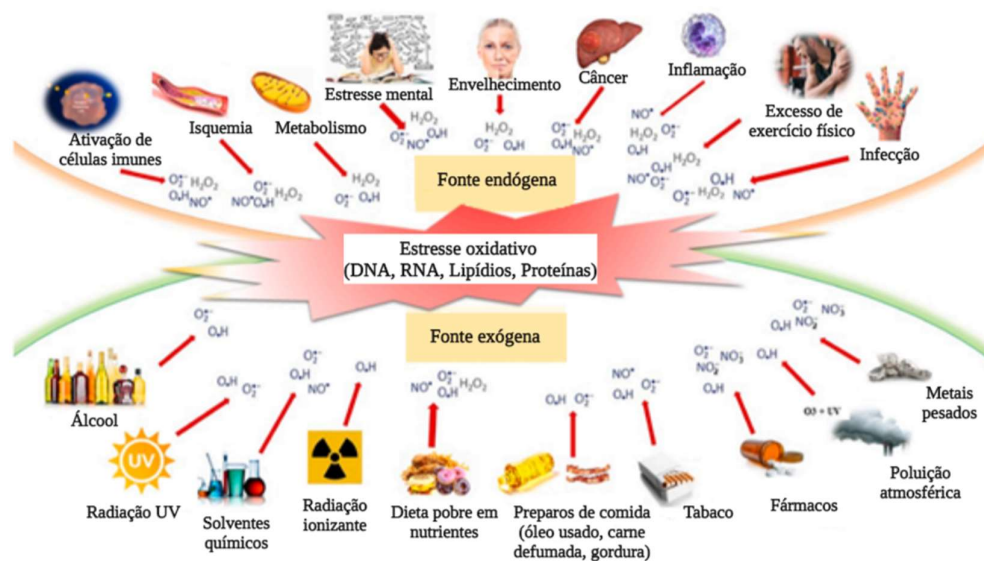


Figura 2.16: Esquema das fontes endógenas e exógenas do estresse oxidativo, e, portanto, da origem das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ($OH^{\cdot}$ = radical hidroxila; $O_2^{\cdot-}$ = ânion superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $NO^{\cdot}$ = radical óxido nítrico; NO_3 = peroxinitrito; NO_2 = dióxido de nitrogênio). Adaptada de [155].

Atualmente, foram identificadas 3 isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no organismo, sendo elas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). A isoforma iNOS é expressa pelos macrófagos quando ativados por LPS ou endotoxinas bacterianas, junto com citocinas como IL-1, TNF- α e IFN- γ , já que a iNOS não é detectada em condições basais [156]. O NO derivado da iNOS desempenha um papel importantíssimo nos macrófagos sobre condições fisiológicas, todavia a superprodução do NO em respostas inflamatórias propicia um desequilíbrio da produção de espécies reativas a nitrogênio (ERNs) e o respectivo consumo no âmbito celular. Como mencionado no item anterior a combinação dos radicais O_2^- e NO gera o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é um produto altamente citotóxico, e em alto nível causa lesões no tecido além de poder causar choque séptico [157]. Portanto, após resposta inflamatória é primordial restabelecer a homeostase, isto é, o equilíbrio do metabolismo celular com relação a produção de EROs e ERNs [158].

2.7.2 Papel dos macrófagos na inflamação

Os macrófagos são células de defesa que apresentam papel essencial na imunidade inibindo ou promovendo a proliferação celular e a reparação tecidual [149, 159]. As respostas funcionais dos macrófagos na defesa consistem em etapas sequenciais, tais como: recrutamento ativo das células para o local da infecção, reconhecimento de micróbios, fagocitose e destruição de microrganismos ingeridos. Além disso, os macrófagos produzem moléculas biologicamente ativas que desempenham muitos papéis importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas [149]. Os macrófagos encontram-se amplamente distribuídos nos órgãos e tecidos conjuntivos, podendo permanecer nos tecidos por meses e tornando-os sentinelas prontas para defender o organismo de qualquer estímulo estranho [160].

Os macrófagos podem apresentar diferentes morfologias e propriedades funcionais após ativação por estímulos externos, como, por exemplo, os patógenos. Dessa forma, essas células são extremamente importantes para assegurar o funcionamento a resposta imune através do controle dos processos inflamatórios, seja inibindo ou promovendo a resposta inflamatória. Sendo assim,

os macrófagos são divididos em duas categorias, clássica e alternativa, de acordo com a polarização fenotípica [148]. Os macrófagos ativados classicamente, denominados de M1, são aqueles que apresentam o fenótipo que os caracterizam pela atividade microbicida e tumoricida, sendo responsáveis, portanto, pela liberação de citocinas de caráter pró-inflamatório, nas quais inibem a proliferação de células malignas e combatem vários patógenos, atuando ativamente na resposta imune [149]. Em contrapartida, os macrófagos ativados alternativamente, denominados de M2, apresentam o fenótipo que os classificam, basicamente, como responsáveis pela resolução da inflamação, logo, liberam citocinas de caráter anti-inflamatório com finalidade de reparar a injúria tecidual [149].

Durante o processo inflamatório os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatória como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, TNF- α e quimiocinas, além de produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila e ânion superóxido (O_2^-) [148]. Também são produzidas espécies reativas a nitrogênio (ERNs), cujo agente primordial é o óxido nítrico (NO). O óxido nítrico induzível (iNOS) é o precursor da produção do NO, quando a célula macrófago é ativada pela presença de um patógeno [149]. Essas cascatas de toxinas mediadoras com finalidade de combater o patógeno, podem promover danos ao tecido caso sejam produzidas de modo excessivo. Portanto, em geral a resposta pró-inflamatória é seguida da resposta anti-inflamatória a fim de se manter um equilíbrio durante o processo inflamatório. Na resposta anti-inflamatória, os macrófagos são ativados alternativamente por meio das citocinas IL-4, IL-10, TGF- β (do inglês, *Transforming Growth Factor- β*) e da prostaglandina [148, 160]. Nesse contexto, deve haver um equilíbrio nas populações dos macrófagos M1 e M2 para um correto funcionamento do organismo (Figura 2.17). Todavia, em caso de disfunção dos macrófagos na resposta inflamatória diversas patologias podem surgir, tais como doenças inflamatórias crônicas no caso de uma maior população de macrófagos M1 (pró-inflamatório), e imunossupressão em caso de uma maior população de M2 (anti-inflamatório) [148, 160-162].

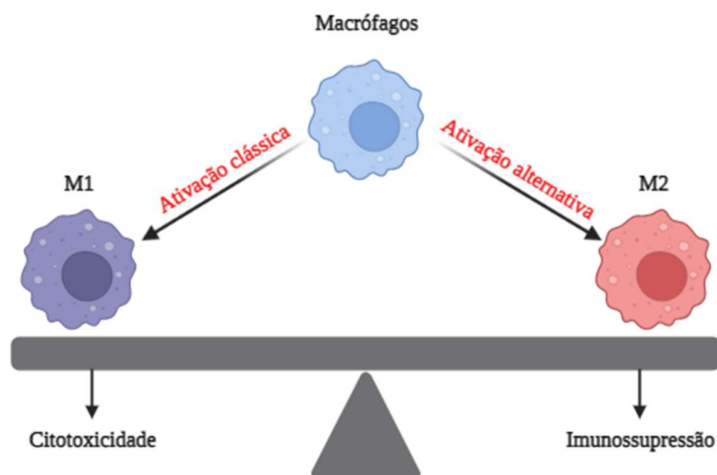


Figura 2.17: Representação do equilíbrio entre os macrófagos M1 e M2. Adaptado de [160].

2.7.3 Linhagem celular RAW 264.7

Como mencionado nos itens anteriores os macrófagos estão, predominantemente, envolvidos em respostas inflamatórias de tal modo que quando ativados produzem mediadores pró-inflamatórios (citocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs)). Dessa forma, para o presente trabalho foi escolhido a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7, na qual, foi estabelecida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina.

Os macrófagos RAW 264.7 são extremamente sensíveis ao lipopolissacarídeo presente em bactérias gram-negativas (LPS). Em vista disso, quando os macrófagos RAW 264.7 são expostos ao LPS ocorre a ativação do receptor *Toll-like 4* (TLR-4), desencadeando, portanto, sinais inflamatórios. Dessa forma, a estimulação das células RAW 264.7 com o LPS tem sido utilizada, de forma recorrente na literatura, para avaliar os efeitos anti-inflamatórios das nanopartículas de ouro. Partindo desse princípio, nos ensaios de EROs e ERNs será utilizado o LPS como precursor do processo inflamatório para que, assim, possa ser avaliado os efeitos das nanopartículas de ouro.

2.8 COVID-19

No final de 2019, identificou-se, inicialmente em Wuhan, na China, os primeiros casos de pneumonia por coronavírus que, lamentavelmente, se espalhou rapidamente por todo o mundo acometendo mais de 500 milhões de infectados e mais de 6 milhões de vítimas fatais, segundo os dados disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) disponíveis em 22 de julho de 2022 [2]. Em 11 de fevereiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) nomeou oficialmente a doença como coronavírus 19 (COVID-19) e em 11 de março de 2022 decretou o estado de pandemia [163].

A COVID-19 é ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave-coronavírus-2), e atua na promoção de infecções no trato respiratório propiciando sintomas tais como: febre, tosse, perda de olfato e paladar, fadiga e dispnéia [5, 164, 165]. O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, que inclui diversas espécies capazes de infectar vários animais selvagens e humanos [166]. O SARS-CoV-2 é um vírus respiratório que apresenta alta transmissibilidade, podendo ser disseminado pela exposição de microgotículas presentes nas exalações de indivíduos infectados ou pelo contato com partículas virais presentes em fômites contaminados [166, 167].

A COVID-19 exibe um amplo espectro de manifestações clínicas desde infecções assintomáticas, leves, moderadas e graves [166, 167]. O quadro mais grave da doença requer internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) para garantir suporte respiratório adequado entre outros tratamentos, uma vez que nesse estágio a doença propicia uma série de danos, dentre os quais podemos citar: síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), dano tecidual, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA, do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*), complicações tromboembólicas, lesão cardíaca e tempestade de citocinas [164-167]. O quadro mais grave da doença pode ser fatal, e, segundo estudos o agravamento está diretamente correlacionado a comorbidades, como, por exemplo, diabetes, hipertensão e obesidade, mas também está atrelado a outras condições como a idade e fatores genéticos [164, 165]. A alta taxa de transmissão, o amplo espectro de manifestações dos sintomas da doença e o grau de gravidade

diversificados complicou o atendimento ao paciente proporcionando uma enorme pressão sobre os sistemas de saúde em todo o mundo.

A resposta viral da COVID-19 se difere resposta de outros vírus respiratórios, como, por exemplo, a influenza [165]. A compreensão da doença, apesar de ainda ser objeto de estudo, mostra uma clara ligação com relação a resposta imune do hospedeiro. O sistema imunológico inato funciona como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, tal como o SARS-CoV-2. As respostas imunes inatas limitam a entrada, tradução, replicação e montagem do vírus, ajudam a identificar e remover células infectadas, além de coordenar e acelerar o desenvolvimento da imunidade adaptativa [164]. Os receptores de reconhecimento de padrão de superfície celular (PRRs) respondem a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) a fim de desencadear respostas inflamatórias e a apoptose celular, como tentativa de limitar a infecção viral e promover a destruição do patógeno [164]. Contudo, a ativação imunológica excessiva pode levar a inflamação sistêmica e agravar a doença [164].

A comunidade científica observou que a COVID-19 está atrelada a uma liberação de citocina "atípica" com sinalização reduzida de interferon tipo II, refutando o advento da tempestade de citocinas [3, 165]. A tempestade de citocinas, também conhecida como síndrome de liberação de citocinas (CRS, do inglês *Cytokine Release Syndrome*) ou hipercitocinemia, é um estado imunológico no qual células imunes, primordialmente, monócitos e macrófagos são ativados exacerbadamente, levando a produção demasiada de citocinas pró-inflamatória, corroborando, portanto, para a hiperinflamação sistêmica [3, 5].

Diante disso, sugeriu-se que a tempestade de citocinas está envolvida na pneumonia associada à doença, além do mais é possível que o vírus SARS-CoV-2 infecte tipos específicos de células como vasos endoteliais no pulmão, parede alveolar ou macrófagos [5]. A tempestade de citocinas está intimamente associada à síndrome de ativação macrofágica (MAS, do inglês *Macrophage Activation Syndrome*) [5]. A síndrome de ativação macrofágica é resultado da proliferação excessiva de macrófagos e pode induzir a patogênese do SARS-CoV-2 através da síndrome do desconforto respiratório agudo nos pacientes com o caso grave da doença [3, 5].

Os pulmões e as vias aéreas são responsáveis pelas trocas vitais de oxigênio e dióxido de carbono, além de serem a porta de entrada para eventuais infecções microbianas, portanto, é de suma importância ter mecanismos imunológicos hábeis e equilibrado [168]. Sendo assim, a pneumonia causada pela COVID-19 quando evolui para a síndrome do desconforto respiratório agudo contribui para edema e fibrose pulmonar, comprometimento das trocas gasosas e, conseqüentemente, a insuficiência respiratória [168], conforme mostra a Figura 2.18. Segundo SONG et al., o vírus invade as células epiteliais pulmonares e os macrófagos alveolares para produzir ácido nucleico da progênie a fim de estimular as células infectadas a liberar mais citocinas e quimiocinas em prol de atrair mais macrófagos pró-inflamatórios para o local da inflamação por meio dos vasos sanguíneos, amplificando, assim, a resposta inflamatória em cascata [163].

Na literatura é reportado que os pacientes acometidos pelo caso mais grave da doença apresentaram maior nível de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-17, TNF- α) bem como D-dímero, proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT) e ferritina [3, 5, 163, 169, 170]. Essas citocinas auxiliam na eliminação de infecções mantendo a homeostase celular, todavia, a liberação desregulada dessas citocinas pró-inflamatórias contribui para a tempestade de citocinas [164]. A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias é uma fonte de estresse oxidativo resultante dos fagocíticos ativados, nos quais originam EROs e ERNs propiciam o desequilíbrio da homeostase celular [155].

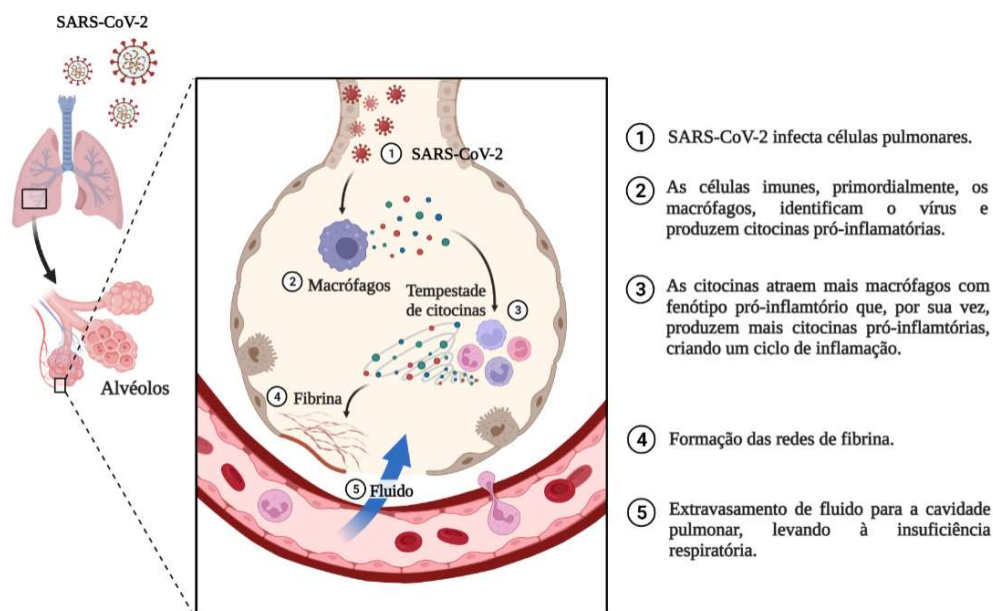


Figura 2.18: Representação esquemática das etapas da infecção nas células pulmonares ocasionadas pelo vírus SARS-CoV-2. Adaptado de [171].

Sendo assim, o controle da tempestade de citocinas no estágio inicial contribui para evitar a morbidade e até mesmo a mortalidade acarretada pela doença, e, nesse sentido, medicamentos imunomoduladores e agentes imunossupressores tem sido objeto de estudo para o tratamento da COVID-19 [172]. O rápido desenvolvimento de vacinas eficazes contra a difusão da COVID-19 [10, 11], não impediu a busca por medicamentos já existentes ou o desenvolvimento de novos medicamentos, de modo que atualmente foi aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA, *European Medicines Agency* da União Europeia e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o fármaco antiviral Paxlovid™, da Pfizer, no tratamento da COVID-19 leve a moderada, todavia essa medicação só atende adultos que não necessitam de oxigênio suplementar e que apresentam risco de progressão para o caso mais grave da doença [12, 13, 173]. O fármaco Paxlovid™ atua de modo a impedir que o vírus se multiplique nas células e consequentemente impedindo que o vírus se dissemine pelo corpo, todavia, a sua eficiência ainda é objeto de estudo. Esse medicamento é composto pelas substâncias nirmatrelvir e ritonavir, em que a primeira corresponde ao ativo contra o vírus e a segunda atua na prolongação do efeito terapêutico da substância nirmatrelvir [13]. Entretanto, a medicação não é

recomendada para adolescentes, crianças, doentes renais ou hepáticos, gestantes e portadores de HIV, fazendo-se necessário estudos sobre outras possíveis formas de tratamento, e, além do mais a segurança e a eficácia do Paxlovid™ para o tratamento da COVID-19 continuam a ser avaliadas [12, 13, 173]. Nesse sentido, pretende-se estudar a relação das nossas nanopartículas de ouro no que tange a modulação das EROs e ERNs e sua possível aplicação como terapia não convencional no tratamento da doença, uma vez que uma possível estratégia para o tratamento da doença consiste justamente no bloqueio da ativação exacerbada dos macrófagos, portanto, compreender o papel dos macrófagos na COVID-19 é fundamental para ajudar a traçar uma terapia adequada.

2.9 Nanopartículas de ouro com propriedade anti-inflamatória e com liberação controlada de monóxido de carbono (CORMs)

As células do sistema imune são a primeira barreira à penetração das nanopartículas em tecidos e células. Logo, os estudos referentes as interações entre as nanopartículas de ouro e os fagócitos, os mecanismos de captação intracelular e, conseqüentemente, as respostas das células imunes tem sido objeto de estudo nos últimos anos [16]. Ademais, estudos mais recentes apontam que as AuNPs podem ter efeito imunomodulador com ação anti-inflamatória e, portanto, grande potencial no tratamento de doenças como artrite reumatoide, aterosclerose e fibromialgia [24, 25].

Nesse sentido, Shukla et al., investigaram a absorção das nanopartículas de ouro com cerca de 3nm em macrófagos RAW264.7 [29]. Shukla et al., concluíram que as nanopartículas entram nos macrófagos através de pinocitose e se localizam principalmente nos lisossomos e no espaço perinuclear [29]. De acordo com os dados obtidos por Shukla et al., as nanopartículas são biocompatíveis, não citotóxicas, não imunogênicas e suprimem a produção de EROs e não causam a produção das citocinas pró-inflamatórias, tal como o TNF- α e a IL-1 β [29]. Nishanth et al., também observaram a inibição das espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas de ouro com tamanhos de 20nm e 40nm [174]. Além disso, Nishanth et al., verificaram que as nanopartículas de ouro não mostraram ativação de NF-kB [174].

As EROs, conforme visto anteriormente, são metabólitos de oxigênio (OH^- , O_2^- , H_2O_2) que estão em sua forma parcialmente reduzida e, portanto, possuem uma forte propriedade oxidante. As EROs são produzidas por NADPH-*oxidase* presentes nos fagócitos e, também, são produzidos como subprodutos da Cadeia Transportadora de Elétrons (ETC, *acrossemia* do inglês *Electron Transport Chain*). Quando o ânion superóxido (O_2^-) combina-se com o NO em taxas de difusão especificamente limitadas, tem-se à formação de ERNs [25]. As EROs induzem o estresse nitrosativo que promove a produção de ERNs [25]. As nanopartículas de ouro são conhecidas por saciar a produção de EROs em fagócitos, de forma dose-dependente, agindo assim como potenciais agentes anti-inflamatórios [25]. De acordo com a literatura as AuNPs podem inferir na atividade das espécies reativas de oxigênio através da inibição da ativação do NF- κ B [174].

Estudos com o uso de LPS também foram realizados, uma vez que ele aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Nesses estudos, foram reportados que as nanopartículas de ouro inibem a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias [25], bem como podem promover a diminuição da produção de NO em macrófagos, estimulados com LPS. Os tratamentos dessas células com várias concentrações de AuNPs proporciona a diminuição da expressão da proteína iNOS, levando a interpretação de que as AuNPs inibem a produção de NO por meio do bloqueio da expressão i-NOS [174]. Ma, Ji Su et al., utilizaram nanopartículas de ouro revestidas com o polímero polietileno glicol (PEG) com tamanho entre 10nm e 15nm em macrófagos RAW264.7, e, nesse estudo foi detectado a inibição da produção de NO quando essas células foram estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) por meio da inibição do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e da expressão de IFN- β [31]. Na Tabela 2.3 é reportado alguns exemplos encontrados na literatura sobre as AuNPs com características anti-inflamatórias e os mecanismos associados a modulação da resposta inflamatória em macrófagos RAW 264.7.

Tabela 2.3: Visão geral sobre o potencial anti-inflamatório de nanopartículas de ouro em macrófagos RAW 264.7

NPs	Tamanho (nm)	Formato	Síntese	Concentração	Mecanismo associado	Referência
AuNPs	~ 3,5	esfera	Química (síntese por redução de borohidreto)	10, 25, 50 e 100 µM	Reduz a produção de EROs e ERNs. Não induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL1-β.	Shukla et al. 2005 [29]
AuNPs-PVP ¹	50	-	Química	0, 5, 25 e 50 mg/ml	Reduz a produção de espécies reativas de oxigênio. Inibe, especificamente, duas citocinas, TNF-α e IL-17, associadas à resposta imune patogênica TH17. Isso ocorre, possivelmente, via modulação de EROs.	Kingston et al. 2015 [175]
AuNPs-PEG ²	10 - 15	-	Química (síntese por redução de citrato de sódio)	0,10,20,40 e 80 µg/ml	Inibe a produção de NO e a expressão de IFN-β em RAW264.7 estimuladas por LPS.	Ma, Ji Su et al. 2010 [31]
AuNPs	10 - 20	esfera	Química	2,5 e 60 µM	Têm um pequeno efeito inibitório na produção da citocina pró-inflamatória TNF.	James, Lloyd RA, et al. 2017 [176]
AuNPs	60	-	Química	0.1, 1.0, 10, 25, 50 e 100 mg/ml	Não induz a produção de EROs intracelular. As AuNPs, também, não têm efeitos aditivos ou sinérgicos significativos na liberação de NO induzida por LPS. As AuNPs não apresentam efeitos aditivos ou sinérgicos, na produção de TNF-α e IL-6 induzida por LPS.	Zhang, Qin, et al. 2011[33]

¹Nanopartículas de ouro revestidas com poli-N-vinilpirrolidona (PVP).
²Nanopartículas de ouro revestidas com o polímero polietileno glicol (PEG).

Tabela 2.3: (Continua)

NPs	Tamanho (nm)	Formato	Síntese	Concentração	Mecanismo associado	Referência
AuNPs	20 e 40	-	Química	1–150 mg/ml	Inibe a produção de EROs. As AuNPs não mostraram ativação de NF-kB e, também, não houve liberação apreciável de IL-6.	Nishanth, Reddy P., et al. 2011 [177]
AuNPs	10 e 300	-	Química	0,005; 0,001; 0,01 e 0,1 g/L	Não houve alteração nos níveis de TNF- α , IL-6 ou IL-10.	Bancos, Simona, David L. Stevens, and Katherine M. Tyner. 2015 [178]
AuNPs conjugadas com catalase ³	50, 80, 100, 200 e 400	esfera	Química	$9,5 \times 10^7$ partículas/ml	As AuNPs com 80 nm, 100 nm e 200 nm foram capazes de reduzir significativamente o nível de EROs após exposição ao H ₂ O ₂ .	Ba Fakh, Fatima, et al. 2020 [34]
CGA-AuNPs ⁴	~ 22,25	esfera	Química (Síntese verde pelo método de redução de ácido clorogênico (CGA))	20 μ M	Inibiu significativamente citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α e outros genes relacionados à inflamação, como COX-2 e IL-6 em macrófagos murinos estimulados por LPS.	Hwahg, Su Jung, et al. 2015 [35]

³ Nanopartículas de ouro conjugadas com a enzima Catalase.
⁴ Nanopartículas de ouro desenvolvidas por um novo método de síntese verde usando ácido clorogênico (CGA).

Uma outra vertente de aplicação das AuNPs é como transportadora de monóxido de carbono (CO) [41, 179]. Nesse caso, temos o perfil de moléculas com liberação controlada de monóxido de carbono (CORMs) como agentes farmacêuticos. As CORMs têm sido amplamente estudadas por suas propriedades anti-inflamatórias, efeitos antiapoptóticos e antiproliferativos [41, 179]. O monóxido de carbono (CO) é reconhecido principalmente como um gás incolor, inodoro, insípido e altamente tóxico devido à sua capacidade de se ligar à hemoglobina com uma afinidade muito maior do que o oxigênio, levando à formação de carboxiemoglobina (COHb) [179]. Entretanto, o CO junto com óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H₂S), são membros de uma importante família de gasotransmissores, que participam de diferentes mecanismos celulares como moléculas sinalizadoras [179, 180].

O CO produzido de forma endógena ocorre como um subproduto da degradação do grupo heme pela enzima heme-oxigenase induzível (HO – 1) [152], [179]. A indução da heme-oxigenase pode ocorrer não apenas pelo grupo heme, mas também por H₂O₂, LPS, NO, citocinas, metais pesados e outros oxidantes [152]. O aumento da expressão da heme-oxigenase induzível pode proteger contra a toxicidade do ONOO⁻, em macrófagos estimulados por LPS, uma vez que o CO pode se ligar ao ferro contido nas enzimas heme como NADPH-*oxidase* e iNOS, de modo a inibir as reações de transferências de elétrons necessários para a produção adicional das espécies reativas que proporcionam o estresse oxidativo (O₂ e NO) [152]. Nesse sentido, Srisook et al. investigaram os efeitos do CO na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e do óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 quando estimulados por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) [152]. Nessa pesquisa, Srisook et al. verificaram que nos macrófagos RAW 264.7 tratadas com CORM-2 ([Ru(CO)₃Cl₂]₂), o CO inibiu a atividade da NADPH-*oxidase* suprimindo a produção das EROs [152].

Fernandes et. al. propuseram a nanoformulação de nanopartículas de ouro conjugadas com CORM-3 (AuNPs@PEG@BSA·Ru(CO)_x), nas linhagens de câncer colorretal HCT116, fibroblastos primários humanos normais e nas linhagens celulares de leucemia monocítica aguda THP-1 [179]. Nesse estudo, foi possível observar um efeito celular mais pronunciado a nível anti-inflamatório e uma reparação tecidual mais rápida [179]. A hipótese de Fernandes et. al. para o aumento da resposta está associada à rápida captação celular da nanoformulação que resulta

em um aumento de CO no interior da célula alvo, com consequente potencialização da resposta [179]. Nessa perspectiva, os efeitos anti-inflamatórios do CO têm sido objetos de estudo nos últimos anos, sendo demonstrado que a inalação de CO em baixas concentrações exerce ações de citoproteção significativas em diferentes e diversos panoramas incluindo malária cerebral experimental, modulação de fenótipos de macrófagos alveolares, doença inflamatória intestinal e encefalomielite autoimune [41, 179]. Sendo assim, os CORMs correspondem a uma alternativa atraente e segura com relação a administração de CO gasoso, uma vez a que segurança e viabilidade do uso do CO como gás inalado permanece incerta devido à falta de especificidade e toxicidade em altas concentrações [41]. Todavia, os CORMs ainda não possuem um perfil farmacocinético atribuível para um desenvolvimento clínico, e, nesse sentido mais estudos são necessários [41].

2.10 Relevância do tema da pesquisa

Para o presente trabalho foi realizado uma busca em diferentes bases de dados da literatura sobre os estudos com tratamento de macrófagos RAW 264.7 com nanopartículas de ouro sintetizadas via ablação a laser a fim de modular a resposta inflamatória. Para a pesquisa sobre a relevância do tema do presente trabalho foram realizadas buscas nas bases de dados da *PubMed*, *Science Direct* e *Scopus*, sendo utilizado o operador lógico booleano “AND” entre as diferentes combinações de palavras-chave, a fim de obter resultados de pesquisa mais precisos, conforme mostra a Tabela 2.4. Diante da pesquisa integrativa realizada, pode-se verificar o quanto incipiente é o uso de nanopartículas de ouro via ablação a laser em tratamentos de macrófagos RAW 264.7 com finalidade de se estudar respostas inflamatórias por meio da modulação das EROs e ERNs. As pesquisas encontradas nos bancos de dados sobre nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser em geral não são relacionadas ao efeito imunomodulador dessas nanopartículas. Por outro lado, há uma vasta gama de artigos relacionados ao uso de nanopartículas de ouro via síntese química e, em um número menor, via síntese biológica no que tange os tratamentos de células macrófagos RAW 264.7, investigação da modulação da resposta inflamatória e até mesmo alguns estudos relacionados a COVID-19.

Tabela 2.4: Busca em base de dados

Base de dados	Palavra-chave	Resultados	Base de dados	Palavra-chave	Resultados
PubMed	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	0	PubMed	AuNPs AND "Macrophages	0
Science Direct	AND "Macrophages RAW 264.7"	0	Science Direct	RAW 264.7" AND Inflammation	2
Scopus	AND Inflammation AND ROS AND NO AND COVID-19	0	Scopus	AND ROS AND NO AND COVID-19	0
PubMed	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	0	PubMed	AuNPs AND "Macrophages	0
Science Direct	AND "Macrophages RAW 264.7"	0	Science Direct	RAW 264.7" AND Inflammation	19
Scopus	AND Inflammation AND ROS AND NO	0	Scopus	AND ROS AND NO	0
PubMed	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	0	PubMed	AuNPs AND "Macrophages	0
Science Direct	AND "Macrophages RAW 264.7"	0	Science Direct	RAW 264.7" AND Inflammation	19
Scopus	AND Inflammation AND ROS	0	Scopus	AND ROS	0
PubMed	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	0	PubMed	AuNPs AND "Macrophages	0
Science Direct	AND "Macrophages RAW 264.7"	0	Science Direct	RAW 264.7" AND Inflammation	25
Scopus	AND Inflammation	0	Scopus		0
PubMed	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	0	PubMed	AuNPs AND "Macrophages	1
Science Direct	AND "Macrophages RAW 264.7"	0	Science Direct	RAW 264.7"	49
Scopus		0	Scopus		2
PubMed		10	PubMed		0
Science Direct	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	147	Science Direct	AuNPs AND Inflammation	2
Scopus		29	Scopus		0
PubMed	AuNPs AND "Pulsed laser ablation"	0	PubMed	AuNPs AND Inflammation AND	0
Science Direct	AND Inflammation	17	Science Direct	COVID-19	206
Scopus		0	Scopus		0

3

Métodos experimentais

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados na síntese e caracterização das nanopartículas de ouro, bem com todo aparato experimental utilizado. Ademais, serão apresentadas as técnicas de caracterização utilizadas para as análises morfológica e estrutural das amostras assim como uma descrição breve da técnica.

Além disso, serão abordados os métodos experimentais de cunho biológico, tais como o cultivo dos macrófagos RAW 264.7, os respectivos tratamentos com as AuNPs e as análises realizadas para elucidar a interação das AuNPs com o ambiente celular.

Uma pequena seção referente às técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), microscopia de varredura (MEV), microscopia de fluorescência, microscopia de contraste de fase, difratometria de raios X (DRX) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram anexadas como material suplementar.

3.1 Instrumentação

Segue abaixo a lista dos equipamentos utilizados e os respectivos métodos experimentais:

- Fonte de laser Q-smart 850 (Quantel, EUA): Ablação a laser pulsado.
- Espectrofotômetro dos respectivos modelos *DH-mini UV-Vis-NIR Lightsource*, (Ocean Optics, EUA); *Infinite® 200* (TECAN, Áustria) e *Synergy™ HTX* (BioTek®, EUA): Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).
- Espectrofluorímetro dos respectivos modelos *Quanta Master™ 40*: Espectroscopia de fotoluminescência.
- Espectrômetro de massa de plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer, EUA): ICP-MS.

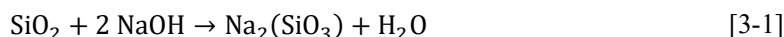
- Microscópio modelo *micro Raman Xplora confocal* (Horiba Jobin Yvon): Espectroscopia Raman.
- Microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 2100F): Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Espectroscopia por Energia dispersiva de Raios X (EDS).
- Difratorômetro de raios X para monocristais da *Oxford*: Difratometria de raios X (DRX).
- DLS do modelo *ZetaSizer Nano Series - ZS* (*Malvern Instruments*, Reino Unido): Espalhamento de luz dinâmico (DLS).
- Microscópio de fluorescência da *GE INCell Analyzer 2000* (GE Health-Care Life Sciences): Microscopia de fluorescência.
- Microscópio eletrônico de varredura (Magellan 400 FEI Company): Microscopia de varredura (MEV)
- Microscópio óptico invertido de contraste de fase (*ZEISS™ Primo Vert™*): Microscopia de contraste de fase

3.2 Materiais

As substâncias químicas como hidróxido de sódio (NaOH), acetona (C₃H₆O), etanol (C₂H₅OH), tricloroetileno (C₂HCl₃), ácido nítrico (HNO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e Pluronic® F127 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os alvos de ouro são provenientes da Kurt J. Lesker Company e apresentam 99,9% de grau de pureza. A água ultrapura destinada ao preparo das soluções de hidróxido de sódio (NaOH) para a ablação a laser exibia condutividade igual a 18,2MΩ.cm, e foi obtida por meio do ultrapurificador Milli-Q e fornecida pelo Laboratório de Eletroanalítica, Espectroanalítica e Análise Elementar Aplicada (LEEA) do Departamento de Química da PUC-Rio. A água destilada e ultrapura designada para a limpeza foi fornecida pelo Laboratório Central de análises Padre Leopoldo Hainberger (LCA) do Departamento de Química da PUC-Rio.

3.2.1 Preparo da solução de hidróxido de sódio (NaOH)

Para preparar as soluções de hidróxido de sódio (NaOH), foi utilizada uma pastilha de NaOH Sigma-Aldrich com 100mg. Para aprontar as soluções aquosas de NaOH em diferentes concentrações é necessário, primeiramente, preparar uma solução estoque contendo 100mM de NaOH em água ultrapura em um tubo Falcon ou em um béquer de Teflon, e aguardar por cerca de 15min para que a pastilha de NaOH dissolva. A solução de NaOH não deve ser armazenada em vidraria, pois ela reage lentamente, conforme mostra a reação [3-1], com a sílica (SiO₂) produzindo silicato de sódio (Na₂(SiO₃)), o que, por sua vez, leva à contaminação da amostra.



A solução estoque é, então, diluída em água ultrapura até a concentração desejada de NaOH. Em seguida, a solução resultante é agitada com o auxílio de uma barra de agitação magnética e um agitador magnético por cerca de 10min. Finalmente, a solução está pronta para a síntese por ablação a laser. Esta solução deve ser armazenada sob refrigeração e retirada da refrigeração pelo menos 20min antes da ablação. A água ultrapura utilizada para preparar as soluções de NaOH apresentava condutividade igual a 18,2MΩ.cm, e foi obtida do ultrapurificador Milli-Q fornecido pelo Laboratório de Eletroanalítica, Espectroanalítica e Análise Elementar Aplicada (LEEA) do Departamento de Química da PUC-Rio.

3.2.2 Pluronic PF127

O copolímero anfílico é um composto químico que possui características hidrofílicas e lipofílicas. Comercialmente o copolímero anfílico que apresenta uma cadeia química dividida em três blocos de polímeros, no qual os extremos são compostos por polioxietileno (PEO) e a parte central é formada por polioxipropileno (PPO), é denominado de Pluronic® F127 (PF127) [181]. Os seguimentos de PEO apresentam características hidrofílicas, enquanto o seguimento PPO apresenta característica lipofílicas (hidrofóbica) [181], conforme mostra a Figura 3.1.

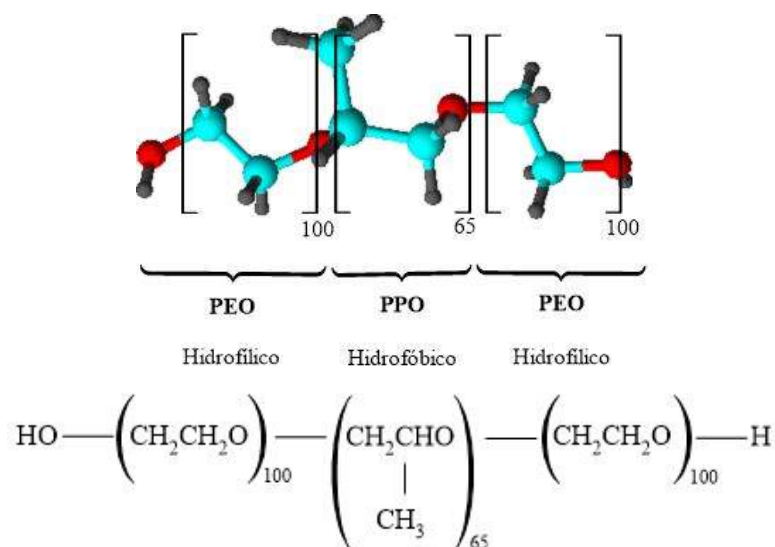


Figura 3.1: Estrutura química do copolímero anfifílico Pluronic® F127. Adaptado de [181] e [182].

Devido ao caráter anfifílico, o Pluronic® F127 expõe capacidade de interagir com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas. Dessa forma o tribloco não iônico, o Pluronic® F127, têm sido alvo de constante estudo e aplicação na área farmacêutica e biomédica por conta da sua baixa toxicidade e a capacidade de solubilização de fármacos, sendo, portanto, aprovadas por *Food and Drug Administration* (FDA) para uso no corpo humano [183-185].

A associação do Pluronic® F127 com nanopartículas metálicas apresenta um futuro promissor no sistema de entrega de fármacos, assegurando estabilidade das nanopartículas e uma maior biocompatibilidade no meio biológico [186]. Simon et. al verificou que o Pluronic® F127 reveste as MeNPs preservando o tamanho e fornecendo uma estabilização estérica [187]. Nesse contexto, o copolímero Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich®) foi colocado na dispersão coloidal de nanopartículas de ouro logo após a síntese por ablação a laser pulsado de modo que a concentração final de Pluronic® F127 na dispersão seja igual a 1mg/mL. Essa concentração foi escolhida com base em outros trabalhos feitos pelo grupo [188]. Para o presente estudo, o Pluronic® F127 foi preparado de acordo com a instrução do fabricante a uma concentração igual a 25mg/mL e armazenadas sob refrigeração.

3.3 Limpeza

O cuidado com a limpeza é fundamental para evitar possíveis contaminações durante a síntese das AuNPs via PLA. Portanto, tanto os béqueres de teflon usados durante a PLA e os vidros utilizados para armazenar a dispersão coloidal das AuNPs quanto os alvos de ouro utilizados para PLA foram submetidos a um minucioso protocolo de limpeza, conforme descrito nos itens decorrentes.

3.3.1 Vidros e béqueres de teflon

Os béqueres de teflon e os vidros destinados a armazenar a dispersão coloidal de AuNPs seguiram o seguinte protocolo de limpeza:

- i. Lavar com solução detergente e enxaguar abundantemente em água corrente, a fim de remover totalmente o detergente.
- ii. Lavar três vezes com água destilada.
- iii. Imergir em solução de ácido nítrico (HNO_3) 10% em água destilada por 24 horas.
- iv. Retirar do ácido nítrico e lavar três vezes com água destilada.
- v. Colocar em banho ultrassônico com tricloroetileno por cerca de 10 minutos.
- vi. Descartar o rejeito apropriadamente e lavar três vezes com água destilada.
- vii. Colocar em banho ultrassônico com acetona por cerca de 10 minutos.
- viii. Descartar o rejeito apropriadamente e lavar três vezes com água destilada.
- ix. Colocar em banho ultrassônico com etanol por cerca de 10 minutos.
- x. Descartar o rejeito apropriadamente e lavar três vezes com água destilada.
- xi. Colocar em banho ultrassônico com água destilada por cerca de 10 minutos.

- xii. Descartar o resíduo e lavar três vezes com água ultrapura.
- xiii. Colocar em banho ultrassônico com água ultrapura por cerca de 10 minutos.
- xiv. Descartar o resíduo.
- xv. Cobrir com papel alumínio e colocar na estufa a 40°C por 24 horas.

Dessa forma, o béquer de teflon está pronto para uso no processo de síntese via PLA e o vidro está pronto para armazenar a dispersão coloidal de AuNPs.

3.3.2 Alvo de ouro

Para a limpeza dos alvos de ouro foi utilizado o seguinte protocolo:

- i. Colocar o alvo de ouro em um recipiente limpo.
- ii. Colocar em banho ultrassônico o alvo de ouro coberto com o ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído 40% em água destilada, por cerca de 10 minutos.
- iii. Descartar o rejeito apropriadamente e lavar abundantemente com água destilada.
- iv. Colocar em banho ultrassônico o alvo de ouro coberto com água destilada, por cerca de 10 minutos.
- v. Descartar o resíduo e lavar abundantemente com água ultrapura.
- vi. Colocar em banho ultrassônico o alvo de ouro coberto com água ultrapura, por cerca de 10 minutos.
- vii. Descartar o resíduo.
- viii. Cobrir com papel alumínio o recipiente com o alvo de ouro e colocar na estufa a 40°C por 24 horas.

Após o processo de limpeza descrito acima, o alvo de ouro está pronto para a PLA em líquido. O processo de limpeza do alvo se deu aproximadamente a cada 10 ablações, uma vez que o alvo de Au oxidou apenas na área correspondente ao ponto de incidência do feixe de laser, podendo, portanto, ser reutilizado.

3.4 Síntese da dispersão coloidal de nanopartículas de ouro via PLA

A síntese das nanopartículas de ouro se deu via ablação a laser em água, através de duas metodologias distintas. A primeira metodologia se deu em atmosfera ambiente e a outra seguiu um esquema experimental em atmosfera controlada com N₂. Foi utilizada uma fonte de laser Nd: YAG pulsado (Figura 3.2 (A)), modelo Q-Smart 850 da Quantel, operado na frequência do segundo harmônico 2ω (532nm) com 6ns de duração do pulso, uma taxa de repetição constante igual a 10Hz e energia máxima de 500mJ/pulso. A fonte de laser Q-Smart 850 utilizada para a síntese, encontra-se no Laboratório de Síntese Ótica e Caracterização de Nanomateriais (NanoLaserLab) do Departamento de Física da PUC-Rio.

O aparato experimental é organizado de tal forma que seja possível realizar uma ablação dupla, otimizando o processo de síntese das nanopartículas. As ópticas utilizadas no esquema experimental foram adquiridas das empresas ThorLab e Lambda, e, apresentavam revestimento antirreflexo para as frequências ω ou 2ω , além de serem desenvolvidas para aplicações de alta potência. A energia do pulso laser foi medida usando um detector piroelétrico de energia (Figura 3.2 (B)), modelo ES220C da ThorLabs, que funciona em uma faixa de comprimento de onda de 0,185 - 25 μ m e uma faixa de energia de 500 μ J - 3J.



Figura 3.2: (A) Fonte de laser Nd:YAG pulsado Q-smart 850 da Quantel, operado com módulo para a frequência do segundo harmônico 2ω . (B) Detector piroelétrico de energia. (C) Controle do laser Q-smart 850.

As Figuras 3.3 e 3.4 mostram o esquema experimental utilizado para a ablação a laser pulsado realizado em atmosfera ambiente. O pulso do laser,

proveniente da fonte Q-Smart 850, é direcionado em um divisor de feixe (BS, do inglês *beam splitter*), no qual separa o pulso laser em energias equivalentes, isto é, 50% de energia para cada lado. Assim, o pulso laser é desviado em duas direções perpendiculares, de tal forma que cada um dos pulsos incide, respectivamente, nos espelhos E_1 e E_2 . Subsequentemente, os espelhos E_1 e E_2 os desviam, respectivamente, para as lentes L_1 e L_2 . Dessa forma, os dois pulsos de laser são focados nos alvos correspondentes a A_1 e A_2 , no qual estão imersos em um determinado volume de líquido nos béqueres 1 e 2.

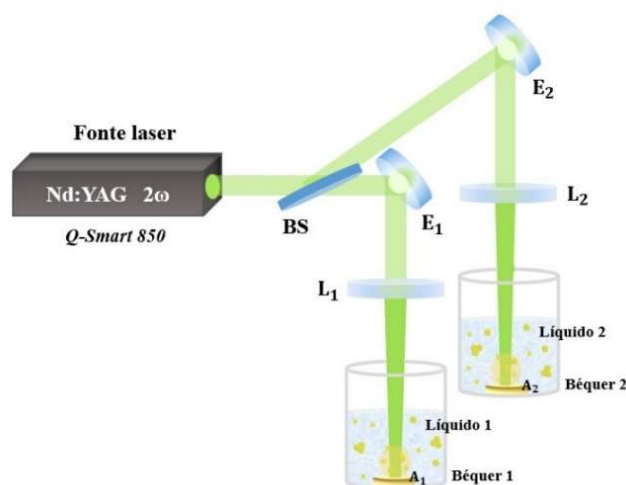


Figura 3.3: Esquema experimental utilizado para PLA. O feixe laser incide no divisor de feixe (BS), em seguida cada um dos feixes divididos incide, respectivamente, nos espelhos E_1 e E_2 , que por sua vez desvia o feixe de laser para as respectivas lentes L_1 e L_2 , na qual focaliza o feixe até os alvos A_1 e A_2 imersos no líquido.

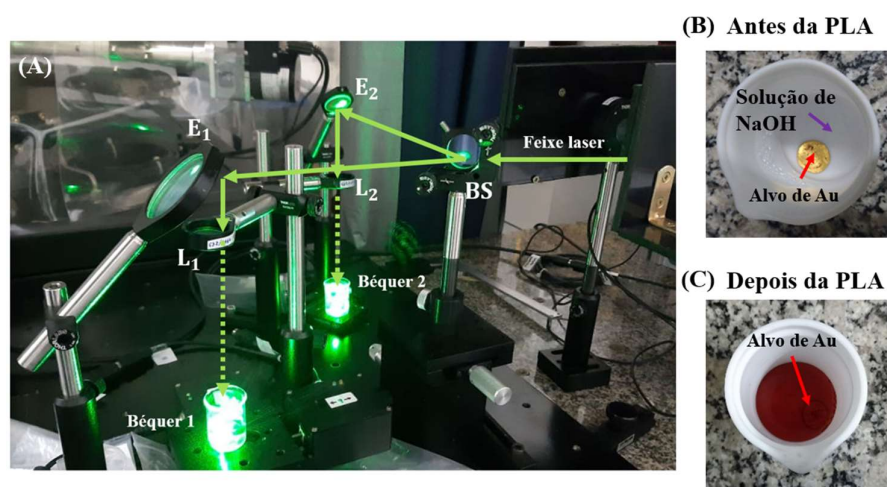


Figura 3.4: (A) Configuração experimental para a síntese de AuNPs por PLA (na imagem foram utilizados béqueres de vidro por finalidade, meramente, didática). (B) Béquer de teflon com a solução de NaOH e o alvo de ouro antes da PLA. (C) Béquer de teflon com a dispersão coloidal de AuNPs e o alvo de ouro logo após a PLA.

Para a síntese das AuNPs feitas em atmosfera ambiente, primeiramente, é necessário preparar as soluções de NaOH. Foram utilizadas soluções com concentrações 2mM e 4mM de NaOH, preparadas conforme descrito no item 3.2.1. Para realizar a ablação a laser do ouro (Au) utilizou-se bquer de teflon com 4,2cm de diâmetro. Dessa forma, são preparados dois bqueres de teflon com 12mL cada da solução de NaOH, e, em cada um deles é colocado um alvo de ouro. Assim, pode-se iniciar a ablação. Ao final da ablação têm-se, portanto, 24mL da dispersão coloidal de AuNPs.

O procedimento de ablação a laser teve duração de 6h, com energia em torno de 12mJ e fluência utilizada de aproximadamente 11J/cm². Ao final da produção das dispersões coloidais de AuNPs via ablação a laser, as amostras foram colocadas no tubo de vidro. Foram preparadas AuNPs com e sem Pluronic[®] PF127. Para as AuNPs com PF127, acrescentou-se ao final da ablação o Pluronic[®] PF127 com concentração de 25mg/mL de tal modo que a dispersão coloidal de AuNPs fique com apenas 1mg/mL de Pluronic[®] PF127. Após a síntese das AuNPs é realizado a medida UV-Vis da amostra. Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz.

A ablação a laser em atmosfera controlada se deu seguindo todos os parâmetros experimentais do laser descritos acima, com exceção da quantidade da solução de NaOH, que passou a ser igual a 5mL. Para realizar a ablação a laser do alvo de ouro em atmosfera controlada, utilizou-se um bquer de vidro projetado para injeção de gases em seu interior. Para que a fluência do laser fosse a mesma que na ablação em ar ambiente, foi necessário calibrar a altura da lente, uma vez que a tampa de vidro do bquer é espessa, mudando o caminho óptico. A linha de gás usada nesta síntese é monitorada por um manômetro digital da New-Ecopress e contém os seguintes gases: N₂ (nitrogênio), CO₂ (dióxido de carbono) e Ar (argônio).

Para a síntese das AuNPs em atmosfera controlada com N₂, foi realizado vácuo no ambiente da ablação (também na água) antes de fluxar a mistura de gases. Sendo assim, a solução de 2mM de NaOH foi colocada no bquer com o alvo de ouro, sendo, portanto, conectado a linha de gás. Primeiramente, é feito vácuo para certificar a limpeza da tubulação de gás, isto é, retirar espécies gasosas indesejadas. Posteriormente, é feito vácuo no interior do bquer de vidro projetado para injeção de gases até que a solução de 2mM de NaOH comece a

borbulhar, feito isso o vácuo é encerrado. Em seguida, injeta-se nitrogênio (N_2) numa pressão diferencial $p_d = p_t - 1\text{atm} = 0,33\text{bar}$ ($p_t = 1.33\text{atm}$), e a válvula de acesso ao bquer é aberta. Posteriormente, a válvula de entrada do bquer é cuidadosamente aberta e, subsequentemente, a válvula de saída do bquer é cautelosamente aberta até atingir $p_d = 0,07\text{bar}$. Ao atingir $0,07\text{bar}$ de pressão diferencial, as válvulas do bquer e de acesso ao bquer são fechadas. O processo de injeção do N_2 é repetido 5 vezes. Após as 5 injeções do N_2 é realizado uma pausa de 30min, e, num momento posterior o N_2 é injetado mais 5 vezes. Essa metodologia foi empregada com a finalidade de retirar o dióxido de carbono (CO_2) gasoso da água usada para o processo de PLA. As Figuras 3.5 (A) e (B) elucidam a configuração experimental para a PLA em atmosfera controlada.



Figura 3.5: (A) Configuração experimental para o preparo da amostra em atmosfera controla. (B) Sistema de PLA em atmosfera controlada (em que E representa o espelho e L a lente).

Depois do processo descrito nos parágrafos anteriores, o material está pronto para a síntese por PLA. A síntese teve duração de 3h e 30min com energia em torno de 12mJ e fluência de aproximadamente $11\text{J}/\text{cm}^2$. Ao final da produção das dispersões coloidais de AuNPs via ablação a laser, as amostras foram colocadas no tubo de vidro, no qual acrescentou-se o $1\text{mg}/\text{mL}$ de Pluronic® PF127 a dispersão coloidal de AuNPs. Após a ablação é realizado a medida UV-Vis da amostra. Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz.

3.4.1 Cálculo da fluência do pulso laser

O cálculo da fluência do pulso laser é extremamente importante, uma vez que é o parâmetro responsável por controlar a distribuição do tamanho e a taxa de produção das nanopartículas sintetizadas [27, 189]. A fluência do pulso laser (F) é definida pela fórmula abaixo:

$$F = \frac{4E}{\pi\phi_A^2} \quad [3-2]$$

sabendo que E é a energia do pulso laser e ϕ_A é o diâmetro da região de interação do pulso laser com o alvo. A energia medida do pulso laser (E), a distância focal da lente usada e o nível da coluna de água que cobre o alvo devem ser considerados para efetuar o cálculo da fluência do pulso laser. É importante ressaltar que a altura do nível da coluna de água que cobre o alvo comporta-se como uma lente durante a propagação do pulso laser, daí a importância em considerar esse parâmetro no desenvolvimento do cálculo da fluência F . Para o cálculo da fluência do pulso laser (F) utilizou-se as leis da óptica geométrica. A Figura 3.6 elucida o pulso laser incidindo na lente convexa e sendo focalizado na superfície do alvo após percorrer a coluna de líquido contido no béquer, representando, portanto, o esquema geométrico usado para efetuar o cálculo da fluência F .

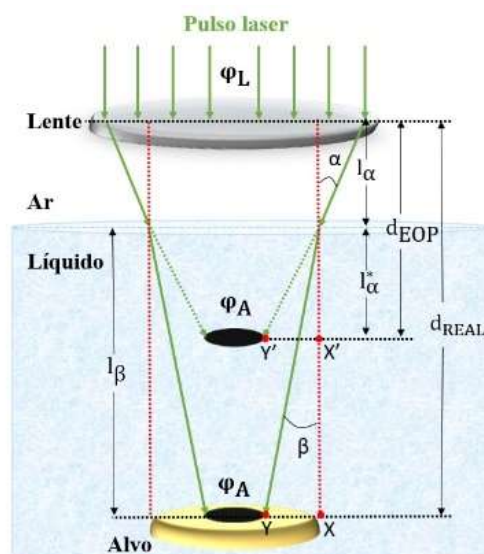


Figura 3.6: Configuração geométrica para o cálculo do diâmetro do pulso laser ao incidir no alvo e da fluência do laser.

Segundo o manual da fonte laser Q-Smart 850 o diâmetro do pulso laser (φ_L) é igual a 0,7cm, portanto, o raio do pulso laser (R_L) é igual a 0,35cm. De acordo com a representação geométrica mostrada na Figura 3.6, fica claro que α corresponde ao ângulo de incidência do pulso laser e β corresponde ao ângulo de refração do pulso laser. Considerando a distância focal da lente no ar igual a $f = 14,9\text{cm}$, podemos encontrar o ângulo de incidência α da seguinte forma:

$$\alpha = \tan^{-1}\left(\frac{R_L}{f}\right) \rightarrow \alpha = \tan^{-1}\left(\frac{0,35}{14,9}\right) \rightarrow \alpha \cong 0,0235\text{rad} \quad [3-3]$$

Usando a Lei de Snell, equação [3-4], e adotando o índice de refração do ar (n_{ar}) igual a 1,0 e o índice de refração da água ($n_{\text{água}}$) igual a 1,3, podemos encontrar o ângulo de refração do pulso laser (β).

$$n_{\text{ar}} \sin \alpha = n_{\text{água}} \sin \beta \quad [3-4]$$

$$\sin(0,0235) = 1,3 \cdot \sin \beta \rightarrow \beta = \sin^{-1}\left[\left(\frac{1}{1,3}\right) \cdot \sin(0,0235)\right] \quad [3-5]$$

$$\beta \cong 0,0177\text{rad}$$

Para calcular a fluência definimos φ_A como o diâmetro do pulso de laser ao incidir no alvo imerso no líquido, que se encontra, de acordo com a Figura 3.6, a uma distância real (d_{REAL}) igual a:

$$d_{\text{REAL}} = l_{\alpha} + l_{\beta} \quad [3-6]$$

em que l_{α} é a distância entre a lente e a superfície do líquido, e l_{β} é a distância entre a interface do líquido com o ar e a superfície do alvo.

Considerando que a propagação do pulso de laser seja sem a presença do meio líquido, o ponto Y', representado na Figura 3.6, indica a altura em que a imagem formada do pulso laser seria da mesma dimensão do que φ_A . Portanto, a distância entre o ponto Y' e o centro da lente corresponde ao caminho óptico equivalente (d_{EOP}), que é calculado por:

$$d_{EOP} = l_{\alpha} + l_{\alpha}^* \quad [3-7]$$

inferindo que l_{α}^* representa a distância entre a interface do líquido com o ar e o ponto Y'. Por trigonometria podemos encontrar o l_{α}^* .

$$l_{\alpha}^* = \frac{\tan \beta}{\tan \alpha} \cdot l_{\beta} \rightarrow l_{\alpha}^* = 0,76 l_{\beta} \quad [3-8]$$

como $l_{\alpha} = d_{REAL} - l_{\beta}$, então,

$$d_{EOP} = d_{REAL} - l_{\beta} + 0,76 l_{\beta} \rightarrow d_{EOP} = d_{REAL} - 0,24 l_{\beta} \quad [3-9]$$

Consequentemente, podemos obter o diâmetro do pulso laser ao incidir no alvo utilizando a seguinte equação:

$$\varphi_{ALVO} = \varphi_{LASER} \frac{(d_{EOP} - f)}{f} \quad [3-10]$$

considerando f como a distância focal da lente no ar.

3.5 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) é composto de uma fonte de luz, um monocromador e um detector, conforme mostra a Figura 3.7. O espectrofotômetro UV-Vis apresenta duas fontes de luz, uma que abrange a região ultravioleta do espectro (em geral, é constituída pela lâmpada de deutério) e a outra que abrange a região visível do espectro (em geral, é composta pela lâmpada de tungstênio) [190]. O monocromador é formado por uma rede de difração que tem como funcionalidade separar os feixes de luz nos comprimentos de onda. Usualmente, o detector é um tubo fotomultiplicador que detecta a luz que atravessou a amostra registrando a intensidade da luz transmitida [190].

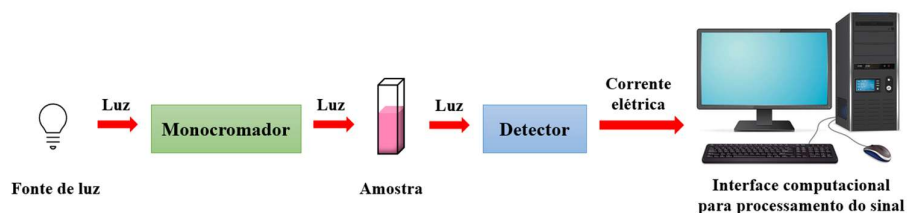


Figura 3.7: Esquema experimental de um espectrofotômetro UV-Vis.

A espectroscopia UV-visível é uma técnica que possibilita o estudo sobre a luz espalhada, absorvida e transmitida por um dado material. O princípio do funcionamento da espectroscopia de UV-Vis está pautado na absorção ou o espalhamento da radiação incidente [190]. Dessa forma, quanto maior for o número de moléculas e/ou partículas capazes de absorver e/ou espalhar as ondas eletromagnéticas, maior será a extinção [190, 191]. Dessa forma, a extinção de uma dispersão coloidal de partículas é formulada pela Lei de Beer-Lambert, dada pela seguinte expressão empírica:

$$E = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon_{\lambda} c l \quad [3-11]$$

em que E é a extinção (densidade óptica), I_0 corresponde a intensidade da luz incidente na amostra e I é a intensidade da luz transmitida no comprimento de onda. O termo ϵ_{λ} representa o coeficiente de extinção molar da amostra para radiação de comprimento de onda λ ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c é a concentração molar do soluto (mol L^{-1}) e l é o caminho óptico (mm) [192]. Essa técnica também permite a análise do coeficiente de extinção, o qual está relacionado com a natureza das nanopartículas metálicas, a concentração, a forma, e o estado de aglomeração [38].

Foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis (*DH-mini UV-Vis-NIR Lightsources*, Ocean Optics) localizado no Laboratório de Espectroscopia de Biomoléculas no Departamento de Física da PUC-Rio. Para análise usamos sempre a mesma cubeta de quartzo com caminho óptico igual a 10mm contendo uma alíquota de 2mL de cada uma das dispersões coloidais de AuNPs. A faixa espectral utilizada para análise das amostras foi entre 200nm e 800nm. Vale ressaltar que foi realizado a medição do branco a fim de retirar a contribuição do espectro da água ultrapura durante a aquisição dos espectros das dispersões

coloidais de nanopartículas. Utilizou-se, também, o espectrofotômetro *Infinite*[®] 200 (TECAN, Áustria), localizado na Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (DIMAV) e o espectrofotômetro Synergy[™] HTX localizado no Laboratório de Bioengenharia Tecidual (LABIO) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Nesse caso, foram utilizadas microplacas transparentes de 96 poços contendo 100µL da dispersão coloidal de AuNPs. Esse último espectrofotômetro também foi usado para a análise biológica.

3.6 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é um método instrumental de análise qualitativa e quantitativa multielementar sequencial rápida e de alta sensibilidade [193]. O ICP-MS pode ser aplicado à análise simultânea de numerosos elementos metálicos e pode determinar a concentração do elemento em níveis de ppm, com resolução de unidades de ppb [194].

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foi utilizada para quantificar a concentração de ouro em cada uma das amostras preparadas seja via PLA ou via síntese química. Para a quantificação da concentração do ouro foi utilizado o ICP-MS com células de reação (NexIon 300X e DRC II) da *PerkinElmer* (EUA) localizado no Departamento de Química da PUC-Rio.

3.7 Liofilização

A liofilização ou a criodessecação é um processo de desidratação e formação de pó por sublimação. Na liofilização a água ou outro solvente é removido por meio da sublimação, ou seja, passagem direta do estado sólido para o estado gasoso [195]. Dessa forma, inicialmente é necessário congelar a amostra antes de colocá-las no liofilizador. Ao final do processo, as nanopartículas que estavam na dispersão coloidal são os produtos e podem ser retiradas do equipamento na forma de pó.

Nesse contexto, a dispersão coloidal de nanopartículas de ouro foi congelada em um freezer comum e posteriormente colocada no Liofilizador

FreeZone (Labconco, U.S.A.) localizado no Laboratório *Van der Graaf*. A amostra foi mantida em vácuo por 4 dias, cuja temperatura do coletor onde as amostras congeladas foram mantidas foi, aproximadamente, igual a -53°C . Ao final do processo, foram produzidas amostras em pó da dispersão coloidal de AuNPs (Figura 3.8). Este procedimento foi realizado para as amostras de AuNPs medida em espectroscopia Raman.



Figura 3.8: Amostra liofilizada das AuNPs, sintetizadas por PLA, com 2mM de NaOH.

3.8 Espectroscopia de fotoluminescência

A espectroscopia de fotoluminescência é realizada com o fluorímetro ou fluorômetro. O fluorímetro é um dispositivo com finalidade de medir a fotoluminescência de uma determinada amostra. A fotoluminescência é um fenômeno óptico no qual a molécula absorve a luz incidente de modo que o elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado [196]. Os elétrons excitados, por sua vez retornarão ao estado fundamental, acompanhados pela emissão de fótons [196].

Com a maioria dos fluorímetros é possível registrar tanto espectros de excitação quanto de emissão. No caso da presente pesquisa, foi realizado espectros de emissão, o qual mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, sendo obtido fixando o comprimento de onda da luz de excitação. A excitação é gerada pela lâmpada de Xenônio (Xe), a qual é focalizada no monocromador de excitação, que por sua vez apresenta a função de separar o comprimento de onda responsável por excitar a amostra [197]. Sequencialmente, a emissão oriunda da amostra é direcionada ao monocromador

de emissão e o sinal obtido será direcionado e amplificado para a fotomultiplicadora sensível ao intervalo correspondente ao espectro visível (200nm a 800nm) [197].

A medida de fotoluminescência foi executada usando um espectrofluorímetro da *Photon Technology International* (PTI) modelo *Quanta Master™ 40* no LOEM do Departamento de Física da PUC-Rio e, também, no espectrofluorímetro modelo QM1 da PTI (Canadá), localizado no Laboratório de Espectroscopia de Biomoléculas no Departamento de Física da PUC-Rio. Em ambos os casos, foram utilizadas cubetas de quartzo com comprimento de caminho óptico igual a 10mm. As amostras foram excitadas em um comprimento de onda na faixa entre 250nm e 800nm para produzir um espectro de emissão. Para essa análise, foram utilizadas fendas de 4nm. O comprimento de onda de excitação, de emissão e as fendas são controladas pelo aparelho, por meio do *software Felix*. A Figura 3.9 ilustra a configuração do espectrofluorímetro *Quanta Master™*.

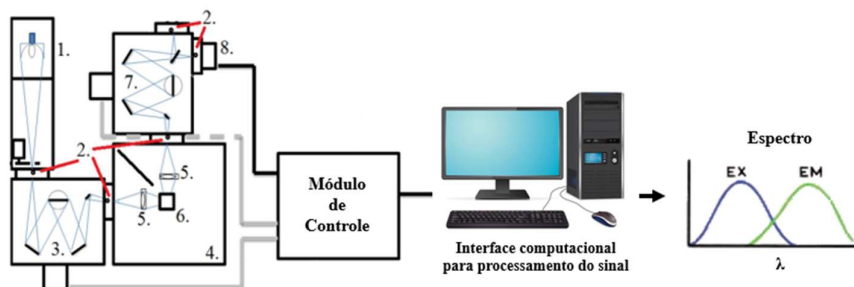


Figura 3.9: Esquema do espectrofluorímetro da *Photon Technology International* (PTI) modelo *Quanta Master™ 40*: 1. Lâmpada de Xenônio (Xe) 75W; 2. Fendas ajustáveis; 3. Módulo monocromador de excitação; 4. Câmara da amostra; 5. Lentes para focalização; 6. Suporte para a amostra; 7. Módulo monocromador de emissão; 8. Fotomultiplicadora. Adaptado de [197].

3.9 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de caracterização que pode ser aplicada ao estudo de amostras sólidas, líquidas e gasosas, na qual permite uma identificação da composição química com base nas características vibracionais [135]. Um espectrômetro Raman é basicamente composto por: uma fonte laser de radiação monocromática (na entrada da excitação), um monocromador que

recolhe a resposta Raman da amostra, o porta amostras e o detector [135]. A Figura 3.10 elucida o esquema experimental do espectrômetro Raman.

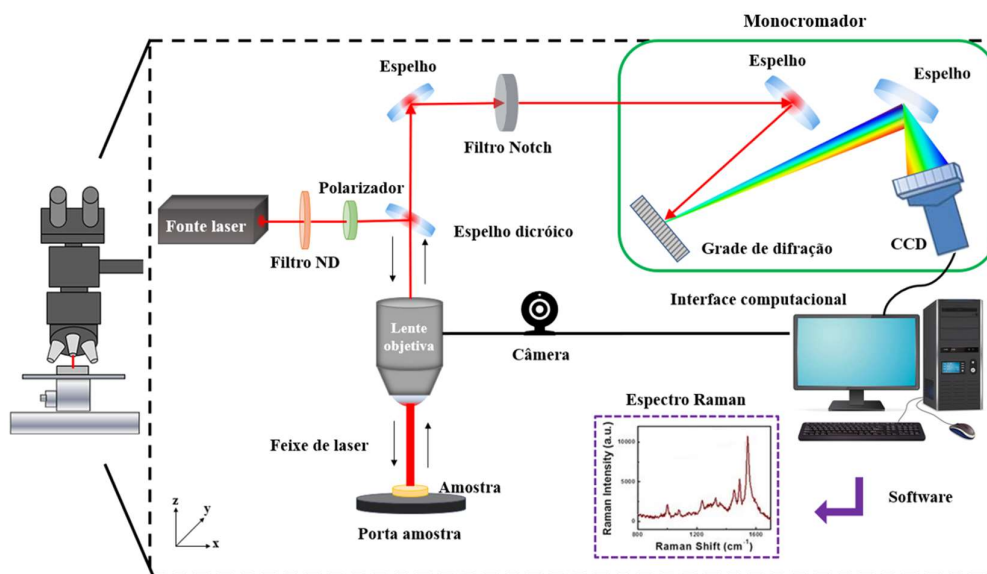


Figura 3.10: Esquema experimental simplificado da espectroscopia Raman. Partindo da fonte laser o feixe monocromático passa pelo Filtro ND (filtro de densidade neutra, cuja finalidade é reduzir a quantidade de luz que entra na lente) e por um polarizador. Na sequência o feixe de luz laser passa pelo espelho dicróico permitindo que esse feixe chegue até a lente objetiva. Assim, a amostra é iluminada pelo feixe de laser, que por sua vez é espalhado por ela. Em seguida, o feixe espalhado retorna pela objetiva e pelo espelho dicróico. Nesse caso, o espelho dicróico atua como um filtro rejeita-faixa que impede a passagem de uma parte da luz espalhada que apresenta o mesmo comprimento de onda da fonte laser. Posteriormente, o feixe de laser atravessa o filtro de passagem de banda (filtro Notch) cuja finalidade é filtrar o restante da luz espalhada (Espalhamento Rayleigh) que apresenta o mesmo comprimento de onda da fonte laser que não foi bloqueada ao passar pelo espelho dicróico. A luz espalhada que não apresenta o mesmo comprimento de onda da fonte laser (Espalhamento Raman) é enviada ao monocromador, no qual separa os feixes de luz nos respectivos comprimentos de onda e o detector tipo CCD (dispositivo de carga acoplada, do inglês Charge-Coupled Device) capta e transmite o sinal para a interface computacional a fim de ser analisado por um software e, consequentemente, gerar o espectro de intensidade da luz espalhada, isto é o espectro Raman. Adaptado de [198].

A espectroscopia Raman foi realizada utilizando o microscópio *micro Raman Xplora confocal* da HORIBA (Figura 3.11), localizado na Central Analítica do Departamento de Química da PUC-Rio. O aparelho é equipado com um dispositivo de carga acoplado CCD com sistema de resfriamento termoelétrico e três fontes de laser de estado sólido nos comprimentos de onda de 532nm, 638nm e 783nm. Para a análise utilizou-se a lente objetiva de 100x, comprimento de onda do laser igual a 638nm e 783nm, filtro de 1%, grade de 600gr/mm, tempo de aquisição igual a 60s e a faixa de estudo se deu entre 200cm^{-1} e 3500cm^{-1} .

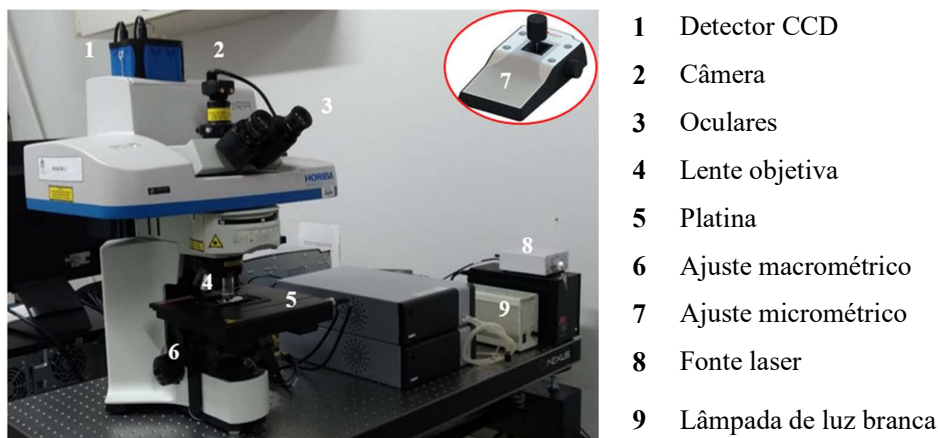


Figura 3.11: Principais componentes do espectrômetro Raman *Xplora confocal* da HORIBA utilizado para a análise.

3.9.1 Preparação das amostras para as espectroscopias Raman e SERS

Para a espectroscopia SERS a dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH preparadas via PLA foram depositadas em um substrato de silício e secas à 40°C em uma estufa a vácuo. Foram depositadas 4, 8 e 12 gotas de volume igual a 60µl em cada substrato de silício, conforme mostra a Figura 3.12. Imediatamente, após a secagem das amostras, realizou-se a espectroscopia SERS.



Figura 3.12: Dispersão coloidal de AuNPs depositadas (4, 8 e 12 gotas) no substrato de silício.

Efetuuou-se, a espectroscopia SERS para as AuNPs com 4mM de NaOH, sendo depositadas 6 gotas com volume igual a 40µL sobre três substratos de vidro. Cada um dos substratos contendo a amostra foram secos em temperaturas distintas, sendo elas 25°C (temperatura ambiente), 40°C, 80°C e 110°C, e prontamente medidos após estarem secas. A espectroscopia SERS também foi feita para as AuNPs com 4mM de NaOH, sintetizadas em atmosfera controlada com 100% de N₂. Nesse caso, foram depositadas 6 gotas de volume igual a 40µl

no substrato de vidro. Tal amostra foi seca, aproximadamente, à 40°C numa estufa e analisada logo após a secagem.

Realizou-se a espectroscopia Raman das AuNPs com 2mM de NaOH feita em ar e liofilizadas. Neste caso, o pó foi apoiado sobre um substrato de vidro, e compressa usando mais uma lâmina de vidro do microscópio (Figura 3.13). Esse procedimento foi aplicado ao fim de minimizar as irregularidades da superfície de pó de nanopartículas a ser analisada, reduzindo o perigo de contaminação da objetiva do microscópio Raman.



Figura 3.13: AuNPs com 2mM de NaOH feita em ar e liofilizadas depositadas no substrato de vidro.

3.10 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é uma técnica usada para o estudo das fases cristalinas de uma ampla variedade de materiais. O difratômetro é um aparelho usado para determinar os ângulos em que a difração ocorre para amostras em pó [199]. Os difratômetros de raios X são compostos por três elementos básicos: um tubo de raios X, um porta amostras e um detector de raios X [199], como ilustrado na Figura A.1(A) do material suplementar. Para investigar as fases cristalinas das AuNPs produzidas por PLA usou-se um difratômetro para monocristais da *Oxford*, situado na Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (DIMAV) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

3.10.1 Preparação das amostras para DRX

Retirou-se da dispersão coloidal de nanopartículas de ouro uma alíquota de 2mL, que foi colocada em um microtubo de 2mL. Em seguida a dispersão coloidal de nanopartículas de ouro foram secas em uma centrífuga a vácuo

(*Vacufluge Plus*, Eppendorf) por cerca de 5h. Dessa forma, todas as nanopartículas de ouro estavam prontas para a análise de Difração de Raios X. As amostras de dispersão coloidal de ouro produzidas via PLA analisadas, foram:

- i. Dispersão coloidal de AuNPs com 0,5mM de NaOH
- ii. Dispersão coloidal de AuNPs com 1mM de NaOH
- iii. Dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH
- iv. Dispersão coloidal de AuNPs com 4mM de NaOH
- v. Dispersão coloidal de AuNPs com 8mM de NaOH
- vi. Dispersão coloidal de AuNPs com 8mM de NaOH dialisada
- vii. Solução com 8mM de NaOH

Todas as amostras mencionadas acima foram submetidas à análise de difração de pó em um difratômetro para monocristais da *Oxford*, composto pelo detector *SuperNova* (Rigaku, EUA). O preparo da dispersão coloidal de AuNPs com 8mM de NaOH dialisada encontra-se no material suplementar, assim como a estratégia de análise (seção A.1).

3.11 Cultivo celular

Para a avaliação do efeito modulador das nanopartículas de ouro na inflamação, foram utilizadas a linhagem macrófagos RAW 264.7 oriundas de camundongos e cedidas pelo *Master Bank* do Laboratório de Bioengenharia Tecidual do Inmetro (LABIO), na qual foi adquirida a partir da Coleção Americana de cultura de células (*ATCC AmericanType Culture Collection, Rockville, MD, USA*). As células encontravam-se em criopreservação e em solução composta pelo meio DMEM-HIGH (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich®*) suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino, SFB, (Gibco™).

Para o ensaio *in vitro* foi descongelado um tubo criogênico de células RAW 264.7 à temperatura ambiente, e expandidos em frasco de cultura celular de 75cm² (Corning® T-25 ou Corning® T-75) em 12mL do meio DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB (Gibco™). O frasco de cultura celular com os macrófagos RAW 264.7 foram mantidos à temperatura de 37°C,

em uma estufa incubadora com atmosfera contendo 5% de CO₂ até obter a confluência, isto é, até a formação da monocamada de células. Para todos os ensaios realizados foi utilizado confluência de aproximadamente 80%. As células foram monitoradas através do Microscópio Óptico Invertido de Contraste de Fase (ZEISS™ Primo Vert™) com câmera acoplada, conforme mostra a Figura 3.14(A). O monitoramento se deu com o auxílio do *software ZEN Lite* disponibilizado pelo microscópio.

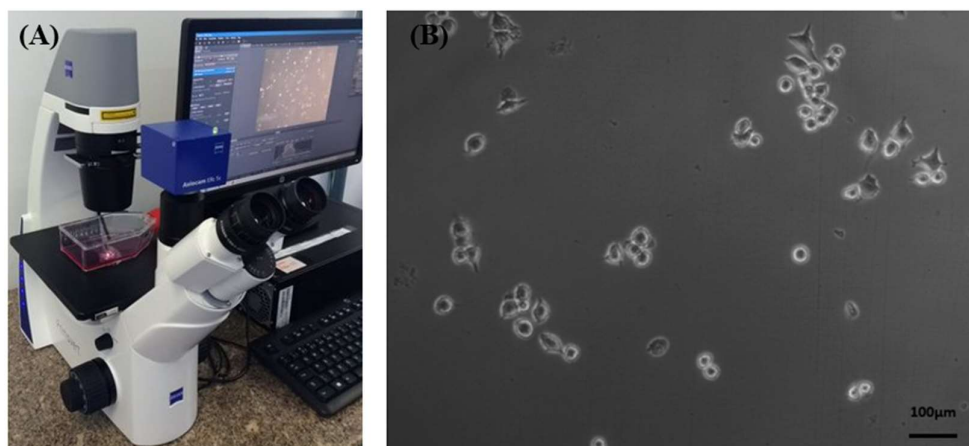


Figura 3.14: (A) Microscópio óptico invertido (Zeiss™ Primo Vert™) com câmera acoplada e conectado a uma interface computacional. (B) Imagem obtida da célula RAW 264.7 por meio do *software ZEN Lite* disponibilizado pelo fornecedor.

Quando as células atingirem a confluência de aproximadamente 80%, o meio de cultura deve ser descartado, e o frasco de cultura celular deve ser lavado com 6mL da solução gentamicina tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* – PBS, Gibco™), com pH 7,4, a fim de evitar que as células mortas sejam plaqueadas. Posteriormente, deve-se descartar o PBS e realizar a raspagem das células com o raspador de células estéril de 32cm (Thermo Scientific™). Em sequência, acrescentou-se 5mL do meio DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB (Gibco™). O meio contendo as células é retirado do frasco de cultura celular, com o auxílio de uma pipeta, e foi colocado em um tubo Falcon esterilizado de 50mL. Em seguida, é realizada a centrifugação desse meio de cultura com as células a 1500rpm durante 5min, a fim de obter a separação das células do meio de cultura. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado restando apenas o *pellet* de células. As células foram ressuspensas adicionando 6mL de DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de

SFB (Gibco™) no tubo Falcon com o *pellet* de células. Subsequentemente, inicia-se a contagem celular para a realização dos ensaios de viabilidade, proliferação, EROs e ERNs.

3.12 Contagem de células

Para realizar a contagem total do número de macrófagos foi utilizado o método da câmara de Neubauer. Partindo da suspensão de células em DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB (Gibco™), colocou-se 10µl da mesma em um microtubo estéril de 1mL. Depois, acrescentou-se 10µl do corante Azul de Trypan já diluído em 0,4% de PBS (Gibco™). Após a homogeneização da solução é possível colocar na câmara de Neubauer para efetuar a contagem celular por meio do microscópio óptico invertido (Zeiss™ Primo Vert™) com câmera acoplada e *software* ZEN Lite disponibilizado pelo fornecedor.

A contagem celular se dá por meio dos quatro quadrantes localizados nas extremidades da câmara de Neubauer, representados esquematicamente pelas letras A, B, C e D na Figura 3.15. A câmara de Neubauer é delineada por grades que identificam as áreas da câmara a serem utilizadas na contagem de células, e apresenta uma profundidade de 0,1mm [200]. Cada uma dessas quatro regiões tem dimensão igual a 1mm × 1mm, sendo, também, dividida em 16 pequenos quadrados [200]. Dessa forma, o volume de cada uma dessas quatro extremidades é dado por 0,1mm³ ou 1,0×10⁻⁴mL [200].

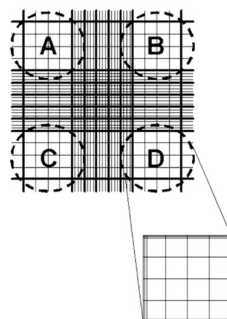


Figura 3.15: Representação da câmara de Neubauer. As letras A, B, C e D representam os 4 quadrantes usados para contagem celular. Cada dos quatros quadrantes são compostos por 16 retículos menores [200].

Foram contabilizadas as células não coradas, isto é, as células viáveis. As células viáveis apresentam a capacidade de excluir o corante Azul de Trypan, ou seja, são as células que sobreviveram [201, 202]. As células inviáveis são aquelas coradas, isto é, que tiveram perda de seletividade da membrana plasmática, comprometendo, portanto, a integridade da membrana e permitindo a difusão do corante no interior da célula [201, 202]. Logo, as células ditas não viáveis são aquelas que estão mortas. A Figura 3.16 elucida a metodologia utilizada para a contagem celular.

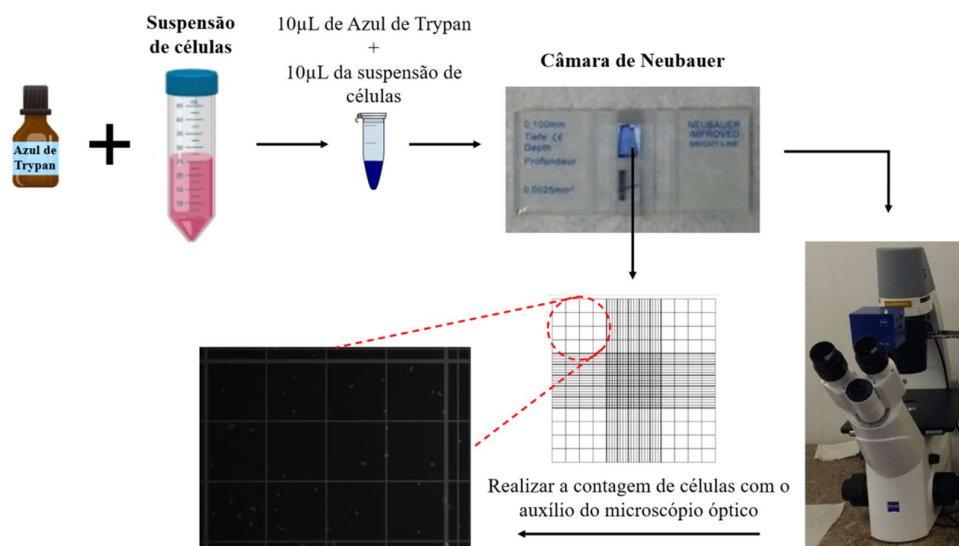


Figura 3.16: Representação esquemática da metodologia utilizada para a contagem celular.

A concentração de células é dada pela soma do número de células viáveis n_v ($n_v = A + B + C + D$) dividido por quatro (número de quadrantes) multiplicado pelo fator de diluição D (no caso, $D = 2$) e pelo fator da câmara de Neubauer (10^4).

$$\frac{n_v}{4} \times D \times 10^4 = \text{Células/mL} \quad [3-12]$$

Também é possível estimar a viabilidade através da razão entre células viáveis e não viáveis após a contagem. O cálculo da porcentagem de células viáveis na cultura é dado por:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{n_v}{n_v + n_i} \times 100 \quad [3-13]$$

em que n_i representa o número de células inviáveis contabilizadas nos quatros quadrantes da câmara de Neubauer. Durante os ensaios realizados foram utilizadas suspensões celulares com percentual de células viáveis superior a 70%.

3.13 Preparo das nanopartículas de ouro para o tratamento em macrófagos

Para o tratamento das células utilizou-se nanopartículas de ouro sintetizadas via ablação a laser, conforme descrito nos tópicos 3.4.1 e 3.4.2. Foram utilizadas as seguintes AuNPs:

- i. Dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH
- ii. Dispersão coloidal de AuNPs com 4mM de NaOH
- iii. Dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH mais Pluronic® F127
- iv. Dispersão coloidal de AuNPs com 4mM de NaOH mais Pluronic® F127
- v. Dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH preparada em atmosfera controlada com 100% de N₂
- vi. Dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH mais Pluronic® F127 preparada em atmosfera controlada com 100% de N₂

As concentrações de NaOH foram escolhidas com base em trabalhos anteriores do grupo [38]. Também foram utilizadas nanopartículas de ouro preparadas via síntese química, disponibilizadas pelo INMETRO. As nanopartículas de ouro obtidas por síntese química foram divididas em presença e ausência do Pluronic® F127 (Sigma-Aldrich®). Para o tratamento das células com as nanopartículas de ouro é necessário, primeiramente, esterilizá-las, e para tal foi utilizado o filtro esterilizado de 0,22µm (*Syringe Filters-K18-230*, KASVI), uma vez que as bactérias têm dimensão ao redor de 0,3µm à 750µm [203] e, portanto, ficam detidas pelo filtro. O procedimento de filtração se deu diante de apenas uma passagem pelo filtro. Dessa forma, as AuNPs filtradas foram colocadas no microtubo estéril e posteriormente foram diluídas 1:5 no meio de cultura DMEM-HIGH, para, então, serem incubadas nas células.

3.14 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar o efeito das nanopartículas de ouro sobre a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7, utilizou-se o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Os particulares da técnica são descritos na seção A.7 do material suplementar.

As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de cultura transparentes de poliestireno e com 96 poços (NEXT) *overnight* em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C, a uma densidade de 3,0x10³ célula/poço. Após adesão *overnight* as células foram tratadas em quadruplicadas com diferentes tipos de AuNPs nas concentrações descritas na Tabela 3.1 e com tempos iguais a 24h, 48h e 72h. Como controle negativo para citotoxicidade, somente meio de cultura DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich), suplementado a 10% de SFB (Gibco™) foi adicionado às células.

Tabela 3.1: Tratamentos e concentrações utilizadas no ensaio de viabilidade celular

Tipo de AuNPs	Síntese	Concentração (µg/mL)
2mM de NaOH	PLA	10, 25 e 50
2mM de NaOH + PF127	PLA	10, 25 e 50
4mM de NaOH	PLA	10, 25 e 50
4mM de NaOH + PF127	PLA	10, 25 e 50
2mM de NaOH em atm controlada com N ₂	PLA	10 e 25
2mM de NaOH + PF127 em atm controlada com N ₂	PLA	10 e 25
AuNPs por síntese química	SQ	10 e 25
AuNPs por síntese química + PF127	SQ	10 e 25

Em que PLA se refere as AuNPs produzidas por meio da ablação a laser pulsado, enquanto SQ representa as AuNPs sintetizadas via síntese química.

Após os respectivos tempos de tratamentos foram descartados os sobrenadantes da cultura celular e adicionado 100µL do meio de cultura DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Gibco™) e conteúdo brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) na concentração de 1,5mg/mL em cada poço tratado com as AuNPs. A fim de obter o controle positivo de morte celular para o ensaio utilizou-se Triton™ X-100 0,1%, com tempo de incubação de 30min em temperatura ambiente antes de iniciar o ensaio

de MTT. As placas de cultura foram incubadas em estufa úmida por um período de três horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 100µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) com o intuito de eluir os cristais de formazana.

As leituras de absorvância foram realizadas por meio do leitor de microplacas multimodal de absorvância Synergy™ HTX, controlado através do *software* Gen5 2.03, a um comprimento (λ) de onda igual a 570nm. Os valores de absorvância obtidos foram descontados dos valores das leituras do controle colorimétrico, uma vez que ele representa um resultado inespecífico já que o comprimento de onda dele encontra-se na mesma faixa das AuNPs. Posteriormente, os dados obtidos foram normalizados em relação ao controle negativo para citotoxicidade e analisados através do *software* GraphPad Prism 9.0 (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, EUA). A Figura 3.17 ilustra o procedimento experimental.

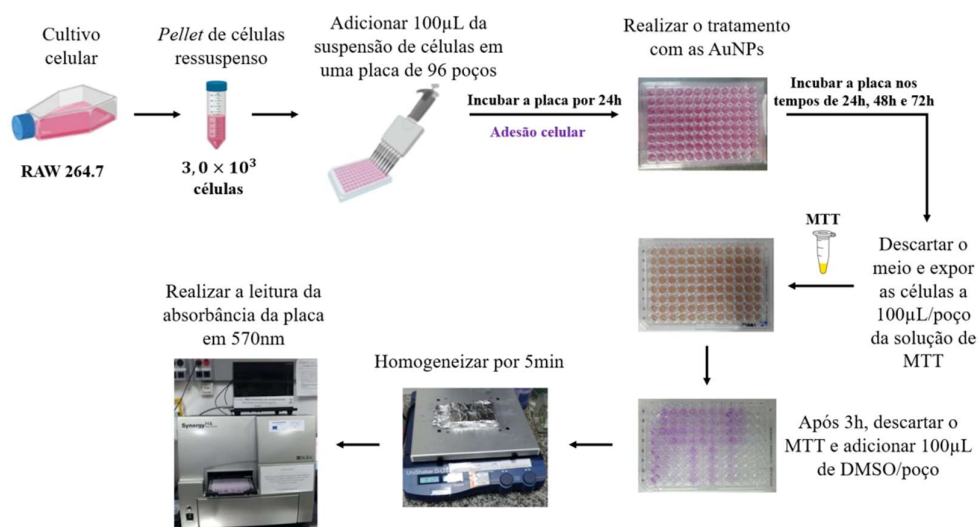


Figura 3.17: Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular por MTT.

3.15 Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação investiga a atividade metabólica das células por meio da divisão celular mediante um determinado tratamento. Para a análise da proliferação celular foram utilizadas células tratadas e não tratadas com as AuNPs. Nesse ensaio, os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueadas em placas

pretas de fundo transparente (Corning Incorporated Costar®) de 96 poços com o fluorocromo 1µM de Hoechst 33342 (Thermo Fisher - Invitrogen) a uma densidade de $3,0 \times 10^3$ célula/poço. O Hoechst 33342 (triclórato de triclórato de 2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol) é um corante que atua na marcação do ácido nucléico, preferencialmente às regiões adenina-timina (A-T) do DNA e emite fluorescência azul de 460 a 490nm [204].

As células foram incubadas na estufa por 24h à temperatura de 37°C e com 5% de CO₂ a fim das células aderirem ao fundo da placa, e, então, serem tratadas com as AuNPs. Após 24h, as células RAW 264.7 foram tratadas com as AuNPs e concentrações descritas na Tabela 3.2. Também foram semeadas células como controle vivo (refere-se a célula na ausência das AuNPs), controle PF127 (refere-se a célula na ausência das AuNPs e com Pluronic® F127) e controle morto (refere-se a célula na ausência das AuNPs e mortas com o dimetilsulfóxido, DMSO).

Tabela 3.2: Tratamentos e concentrações utilizadas no ensaio de proliferação celular

Tipo de AuNPs	Síntese	Concentração (µg/mL)
2mM de NaOH	PLA	10 e 25
2mM de NaOH + PF127	PLA	10 e 25
4mM de NaOH	PLA	10 e 25
4mM de NaOH + PF127	PLA	10 e 25
2mM de NaOH em atm controlada com N ₂	PLA	10 e 25
2mM de NaOH + PF127 em atm controlada com N ₂	PLA	10 e 25
AuNPs por síntese química	SQ	10 e 25
AuNPs por síntese química + PF127	SQ	10 e 25

Em que PLA se refere as AuNPs produzidas por meio da ablação a laser pulsado, enquanto SQ representa as AuNPs sintetizadas via síntese química.

A análise foi realizada em triplicata e nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h a 37°C e em 5% de CO₂. Foi utilizado o sistema de análise celular de alto conteúdo GE InCell Analyzer 2200 (GE Health-Care Life Sciences) para gerar automaticamente imagens de fluorescência de 6 campos de cada poço. Para a análise realizada com o GE InCell Analyzer 2200 foram utilizados os seguintes

parâmetros: lente objetiva de 10X, comprimento de onda (λ) igual a 461nm, filtro DAPI e região espectral entre 432nm e 480nm.

As imagens adquiridas foram analisadas por meio do *software* GE INCell Analyzer1000 workstation (GE Healthcare Life Sciences) através de algoritmos de detecção automática do núcleo celular, nos quais foram quantificados, automaticamente, para estimativa da proliferação celular. Os gráficos dos resultados da proliferação celular foram obtidos a partir do valor das médias do número de células em cada condição experimental. A Figura 3.18 ilustra o procedimento experimental.

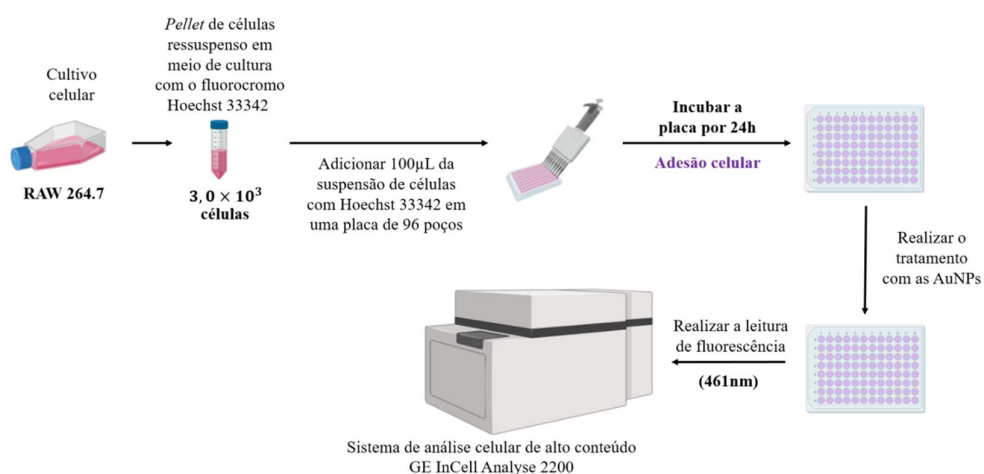


Figura 3.18: Representação esquemática do ensaio de proliferação celular.

3.16 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizou-se o DHE (5-etil-5,6-dihidro-6-fenil-3,8-diaminofenantridina, hidroetidina) como uma sonda para superóxidos. Os particulares da técnica são descritos na seção A.8 do material suplementar. Na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) as células RAW 264.7 foram plaqueadas em duas placas para cultura de células com 96 poços, estéril, produzida em poliestireno com fundo plano e superfície tratada para adesão celular (NEXT). As células foram plaqueadas com o fluorocromo 1µM de Hoechst 33342 (Thermo Fisher - Invitrogen) a uma densidade de 10⁴ célula/poço. As células foram incubadas na estufa por 24h à temperatura de 37°C e com 5% de CO₂. Após 24h,

as duas placas contendo as células RAW 264.7 foram tratadas com as AuNPs descritas no item 3.13. A Tabela 3.2, apresentada no item 3.15, consta as concentrações utilizadas para as respectivas nanopartículas de ouro. Também foram semeadas células como controle (refere-se a célula na ausência das AuNPs), controle PF127 (refere-se a célula na ausência das AuNPs e com Pluronic® F127) e controle morto (refere-se a célula na ausência das AuNPs e mortas com Triton X - 100 (0,1%)). No entanto, em uma das placas além das AuNPs os macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 1ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS, acrosemia do inglês *Lipopolysaccharides from Escherichia coli* – O111:B4, Sigma-Aldrich). Nesse caso, foram semeadas células com LPS, sendo denominada de controle LPS. Os tratamentos foram realizados em quadruplicata no tempo de 24h. Depois de 24h descartou-se o meio de cultura e subsequentemente cada poço foi lavado três vezes com 200µL de solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* – PBS, Gibco™) estéril. Adicionou-se 200µL de dihidroetídio a 5µM (DHE) em cada poço das duas placas, sendo encubadas a 37°C por cerca de 15min. Após 15min realizou-se a lavagem de cada poço de ambas as placas com 200µL de PBS (esse procedimento se repetiu duas vezes). Posteriormente, acrescentou-se 200µL do fixador formaldeído (4%) em ambas as placas por 15min em temperatura ambiente (25°C). Depois de 15min as células foram lavadas com 200µL de PBS e armazenadas com 200µL de PBS, estando prontas para a análise de EROs.

A análise foi realizada por meio de fotomicrografias de fluorescência obtidas com o sistema de análise celular multiparamétrica IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences), para a quantificação da marcação com dihidroetídio (DHE), utilizando-se o conjunto de filtros de excitação/emissão correspondentes ao fluoróforo 'Cy3'. As imagens adquiridas foram analisadas por meio do software GE IN Cell Analyzer 1000 workstation (3.7.2, build 1860) através de algoritmos de segmentação automatizada dos núcleos marcados, seguida de medição da intensidade média dos respectivos pixels. O sinal de fluorescência está atrelado justamente a presença de EROs, uma vez que em sua presença há oxidação do 2-hidroietídio a etídio (EthD-1), portanto, quanto mais etídio livre maior será a intensidade do sinal e, consequentemente, maior será a produção de EROs. Os gráficos dos resultados das espécies reativas de oxigênio

foram obtidos a partir do valor da intensidade média do pixel dos macrófagos RAW 264.7 em cada condição experimental.

3.17 Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

As células RAW 264.7, em meio de cultura DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich) suplementado a 10% de SFB (Gibco™), foram cultivadas em placas de cultura estéril de fundo plano com 96 poços por *overnight* em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C, a uma densidade de $1,0 \times 10^4$ célula/poço. Após 24h, as células foram tratadas com as nanopartículas. Depois de 24h foi adicionado o LPS. Como controle positivo os macrófagos RAW 264.7 foram tratados com 1µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS, acrosemia do inglês *Lipopolysaccharides from Escherichia coli* – O111:B4, Sigma-Aldrich) e como controle negativo para a produção de óxido nítrico somente o meio DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich) foi adicionado as células RAW 264.7. Nesse ensaio, utilizou-se as AuNPs por ablação a laser feita em ar com concentração de tratamento de cerca de 15-20µg/mL.

Após 24h os sobrenadantes dos respectivos tratamentos foram descartados e 100µg/mL de meio de cultura foi acrescentado, esse procedimento é importante para garantir que não haja nanopartículas no sobrenadante a fim de não interferir na medida de absorvância. Depois de 24h os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de NO, uma vez que o NO produzido pela célula é liberado para o sobrenadante. Cerca de 100µg/mL do sobrenadante foi transferida para uma nova placa estéril de fundo plano com 96 poços. Adicionou-se aos sobrenadantes 100µg/mL do reagente Griess (sulfanilamida 0,1%; N-naftil-etilenodiamino 0,1% e ácido fosfórico a 3%) em temperatura ambiente por 30min. A leitura de absorvância foi realizada por meio do leitor de microplacas a um comprimento de onda (λ) igual a 540nm. A absorvância obtida foi relacionada a uma curva padrão de NaNO₂ previamente construída com concentrações crescentes de 0,78 a 65 µM. Sabendo que a partir da curva padrão é possível extrair a equação da reta, em que a variável dependente (y) corresponde a absorção e a variável independente (x) corresponde a concentração de nitrito. Todos os dados foram analisados através do *software* GraphPad Prism 9.0 (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, EUA).

3.18 Avaliação morfológica por meio da microscopia óptica invertida de contraste de fase

A avaliação morfológica da linhagem celular macrófagos RAW 264.7, após o tratamento com as diferentes AuNPs (descritas no item 3.13) e concentração igual a 10µg/mL foi realizada através de obtenção de imagens pelo *software* ZEN Lite acoplado ao Microscópio Óptico Invertido de Contraste de Fase (ZEISS™ Primo Vert™), cujo princípio e funcionamento está descrito no material suplementar (seção A.6). Para a avaliação foi utilizado a objetiva de 20X de aumento, sendo investigados os períodos de 24h, 48h e 72h após o tratamento. Para a análise, também, foram utilizadas células cultivadas com o meio de cultura DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Gibco™) em ausência de AuNPs e células tratadas com Triton™ X-100 0,1% por cerca de 30min.

3.19 Avaliação morfológica por meio da microscopia de varredura (MEV)

A avaliação morfológica por meio da microscopia de varredura (MEV) se deu a partir dos resultados obtidos diante do ensaio de citotoxicidade por MTT, o qual foi escolhido, portanto, dois tratamentos em que apresentaram menor taxa de citotoxicidade, sendo eles 10µg/mL de AuNPs com 2mM de NaOH na presença e na ausência do Pluronic® F127, com 48h de tratamento. Também foi utilizada a células RAW 264.7 sem nenhum tratamento como controle da morfologia. O preparo da amostra está descrito na seção A.4.1 do material suplementar. A análise foi realizada no INMETRO, por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) *Magellan 400 FEI Company*.

4

Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados no que tange a caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de ouro. Também contempla as análises de cunho biológico nas células RAW 264.7 diante do tratamento com as nanopartículas de ouro.

4.1 Caracterização**4.1.1 UV-Vis e ICP-MS**

Com o objetivo de verificar a estabilidade das AuNPs sintetizadas por PLA em água feitas em ar e em atmosfera controlada com N₂ e das AuNPs produzidas por síntese química realizamos UV-vis. Nessa análise também foi possível estimar os tamanhos das AuNPs usadas no trabalho. Realizou-se também a quantificação com relação a concentração das AuNPs utilizadas no presente trabalho, por meio do ICPMS. A síntese de nanopartículas via ablação a laser em água, conforme descrito no Capítulo 3, está associada a uma série de parâmetros e procedimentos metodológicos que vão determinar o tipo de dispersão coloidal obtida. A Tabela 4.1 descreve os parâmetros utilizados para a PLA em água realizadas no ar ambiente e em atmosfera controlada com N₂.

Tabela 4.1: Parâmetros da síntese de AuNPs por PLA em água

Parâmetros	PLA em ar	PLA em atmosfera controlada
Tempo de ablação (t)	6h	3h e 30min
Volume de líquido	12mL	5mL
Altura da coluna de água (l_{β})	1,2cm	1,4cm
Distância entre a lente e o alvo (d_{REAL})	14,60cm	15,02cm
Comprimento de onda (λ)	532nm	532nm
Duração do pulso laser	6ns	6ns
Energia (E)	12,04mJ	12,04mJ
Fluência (F)	11,10J/cm ²	11,30J/cm ²

Seguindo os parâmetros adotados para a síntese por PLA em água temos um padrão característico, sendo que a cor dos coloides tem relação direta com a concentração, formato e tamanho das nanopartículas. A Figura 4.1, mostra uma imagem das cores típicas das nanopartículas utilizadas para as análises e experimentos desse trabalho. As AuNPs permaneceram estáveis por várias semanas ou mesmo alguns meses, principalmente as que foram misturadas ao copolímero Pluronic® F127, o que está de acordo com os trabalhos [187] e [188]. As AuNPs sintetizadas via química foram disponibilizadas pelo INMETRO.

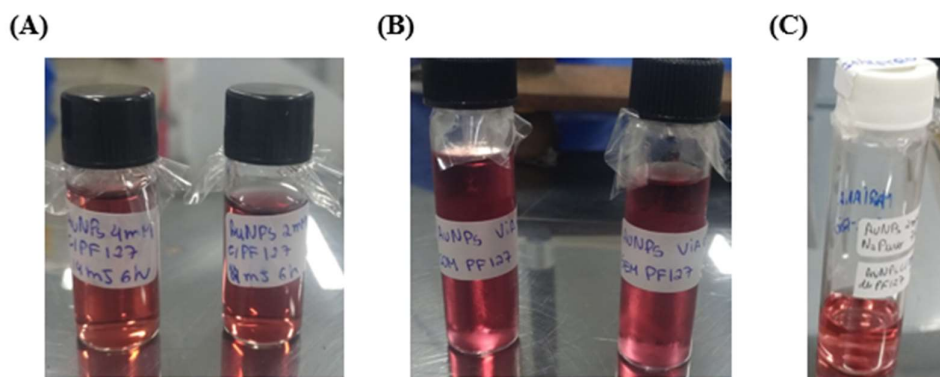


Figura 4.1: (A) Dispersão coloidal de AuNPs produzidas por PLA em ar. (B) Dispersão coloidal de AuNPs sintetizadas via química. (C) Dispersão coloidal de AuNPs sintetizadas por PLA em atmosfera controlada com N_2 .

Na Figura 4.2 são apresentados os espectros típicos das nanopartículas de Au sintetizadas por ablação a laser pulsado em solução aquosa produzidos em ar e atmosfera controlada com N_2 , assim como as AuNPs sintetizadas por via química. Na Figura 4.3 também são apresentados os mesmos espectros, mas dessa vez todos foram normalizados para 1, no comprimento de onda onde ocorre o máximo da ressonância de Fröhlich. Analisando os gráficos correspondentes as Figuras 4.2 e 4.3, fica evidente que todas as nanopartículas usadas no presente trabalho apresentaram ressonância plasmônica, estando em acordo com as previsões teóricas e trabalhos experimentais [134, 205].

Os espectros de extinção são ferramentas poderosas que permitem analisar propriedades das dispersões coloidais das nanopartículas, tal como o tamanho. Sendo assim, a posição espectral e a intensidade do pico LSPR em um dado espectro é usada para análises dos espectros de extinção com relação as propriedades das nanopartículas. Nesse sentido, a razão entre a intensidade

máxima próxima ao 520nm e a intensidade mínima próxima a 440nm é linearmente dependente do tamanho médio das nanopartículas de ouro [205]. De acordo com essa previsão, as AuNPs sintetizadas por PLA em água em todas as condições usadas nesse trabalho apresentam um raio médio em torno de 2nm. As dispersões coloidais de AuNPs produzidas via síntese química apresentaram um pico de extinção máximo em 520nm corroborando com estudos anteriores que apontam que tal espectro de extinção é característico de nanopartículas com diâmetro igual a 15nm [206]. A Tabela 4.2 reporta o valor do comprimento de onda máximo e o respectivo valor da extinção óptica para todas as AuNPs utilizadas no presente trabalho. Além do mais, é possível observar que as AuNPs na presença de Pluronic® F127 apresentam maior absorção em relação as AuNPs sem o Pluronic® F127.

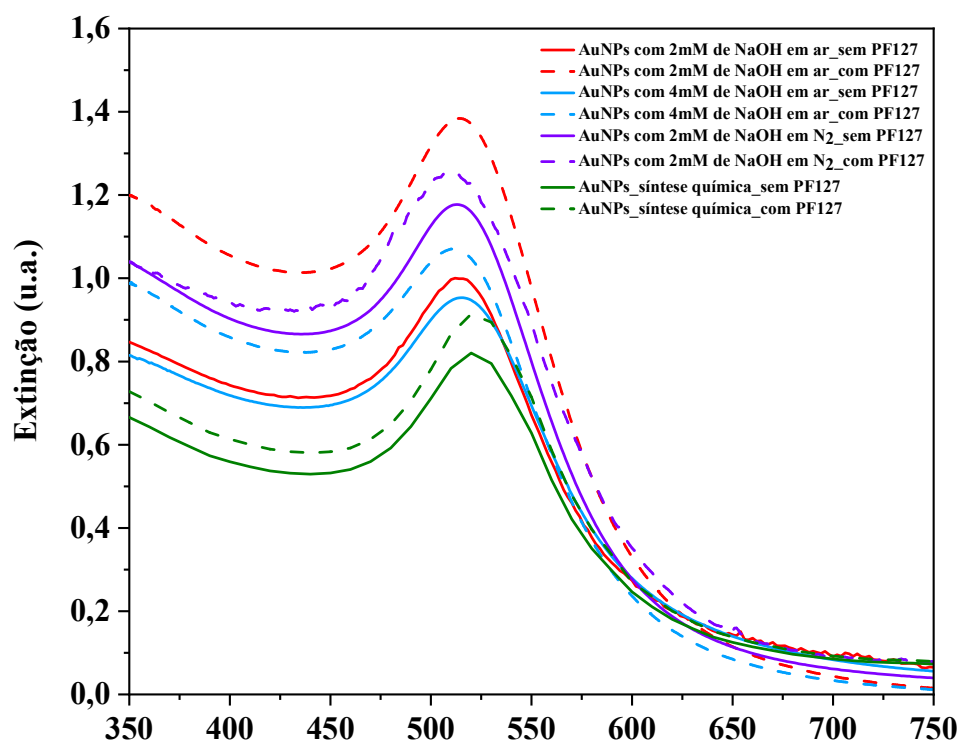


Figura 4.2: Espectros de extinção não normalizados das dispersões coloidais de AuNPs. Espectro de extinção das AuNPs com Pluronic® F127 foram representados por meio das linhas pontilhadas, enquanto os espectros sem o Pluronic® F127 correspondem a linha sólida.

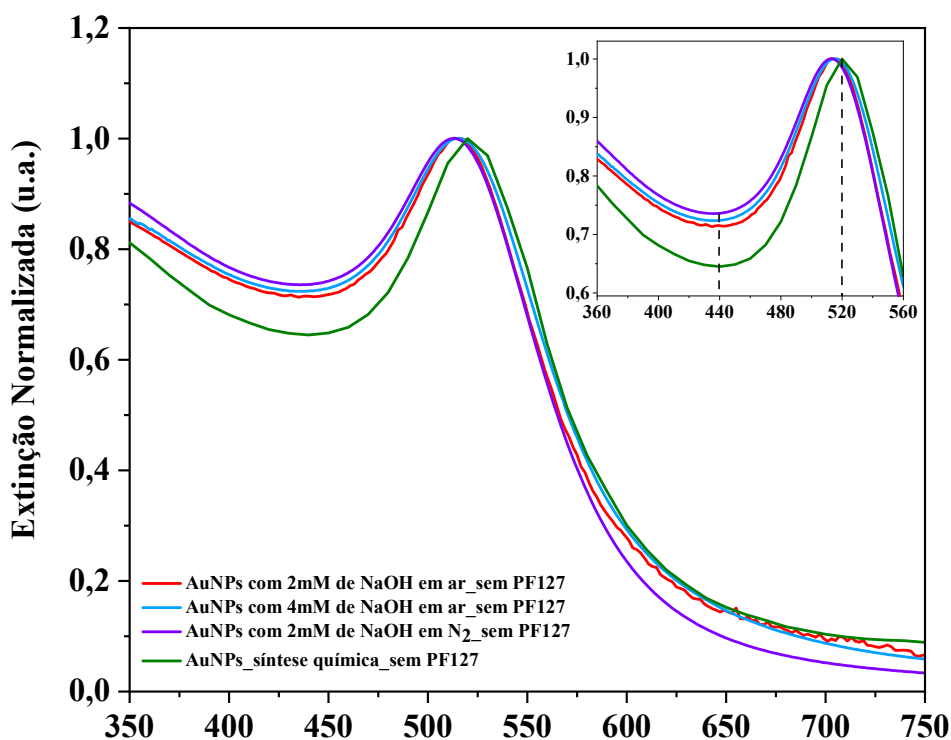


Figura 4.3: Espectros de extinção normalizado a 1 das dispersões coloidais de AuNPs. Espectro de extinção das AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH sintetizadas por PLA em ar ambiente (vermelho e azul), espectro de extinção das AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas por PLA em atmosfera controlada de N₂ (roxo) e espectro de extinção das AuNPs sintetizadas por via química (verde). Todos os espectros de extinção foram realizados na ausência de Pluronic® F127.

Tabela 4.2: UV-Vis das dispersões coloidais de AuNPs

Dispersão coloidal	λ (nm)	Extinção (u.a.)
AuNPs com 2mM de NaOH	515	1,01
AuNPs com 2mM de NaOH + Pluronic® F127	514	1,38
AuNPs com 4mM de NaOH	514	0,96
AuNPs com 4mM de NaOH + Pluronic® F127	510	1,07
AuNPs com 2mM de NaOH preparada em atmosfera controlada com 100% de N ₂	512	1,17
AuNPs com 2mM de NaOH + Pluronic® F127 preparada em atmosfera controlada com 100% de N ₂	507	1,25
AuNPs via síntese química	520	0,83
AuNPs via síntese química + Pluronic® F127	520	0,92

A concentração de ouro nas dispersões coloidais de AuNPs preparadas seja via PLA em água ou via síntese química foi determinado por espectrometria de

massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), cujo valores se encontram na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valor da concentração de ouro medida por ICPMS

Dispersão coloidal	ICPMS (mg/L)
AuNPs com 2mM de NaOH + Pluronic® F127	91
AuNPs com 4mM de NaOH + Pluronic® F127	70
AuNPs com 2mM de NaOH + Pluronic® F127 preparada em atmosfera controlada com 100% de N ₂	62
AuNPs via síntese química	37,7

Diante dos resultados obtidos pelo espectro de extinção, verificamos que todas as nanopartículas usadas no presente trabalho apresentaram ressonância plasmônica. Por meio do espectro de extinção, também, foi possível estimar o raio médio das AuNPs sintetizadas por PLA em água, sendo, aproximadamente, igual a 2nm para as nanopartículas produzidas em ar e em atmosfera controlada de N₂. A correspondência do valor do raio médio das nanopartículas por PLA para todas as condições se deve ao fato utilizarmos a mesma fluência durante o processo de síntese.

4.1.2 Potencial Zeta

Com a finalidade de investigar o potencial eletrostático que existe na superfície das nanopartículas revelando informações sobre a carga superficial e, consequentemente, a estabilidade das nanopartículas preparadas foi realizado o Potencial Zeta. As medidas de Potencial Zeta (ξ) demonstraram o perfil aniônico das dispersões coloidais de AuNPs sintetizadas por PLA, conforme ilustra a Figura 4.4 e a Tabela 4.4. Diante da análise foi possível observar que há uma diminuição da carga das AuNPs com Pluronic® F127.

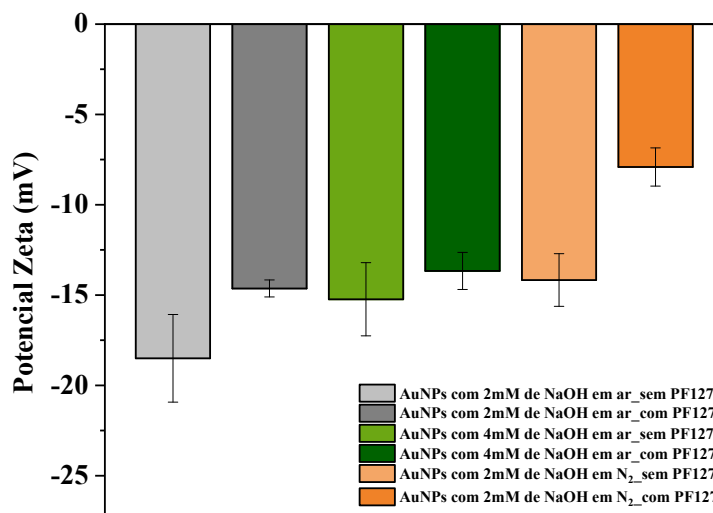


Figura 4.4: Gráfico da análise no DLS do potencial Zeta das dispersões de AuNPs sintetizadas por PLA em água.

Tabela 4.4: Potencial Zeta das dispersões para as AuNPs sintetizadas por PLA

Dispersão coloidal	ζ (mV)
AuNPs com 2mM de NaOH	- 19±2
AuNPs com 2mM de NaOH + Pluronic® F127	-14,6±0,5
AuNPs com 4mM de NaOH	-15±2
AuNPs com 4mM de NaOH + Pluronic® F127	-13,6±1
AuNPs com 2mM de NaOH preparada em atmosfera controlada com 100% de N ₂	-14±1
AuNPs com 2mM de NaOH + Pluronic® F127 preparada em atmosfera controlada com 100% de N ₂	-7,9±1

A carga superficial negativa das nanopartículas obtidas por ablação a laser pode estar atrelada ao fato delas serem parcialmente oxidadas, formando compostos Au-O na superfície das nanopartículas [96]. Ademais, é possível observar que o Pluronic® F127 mascara a atividade eletroestática das AuNPs. Os resultados encontrados indicam um menor potencial de toxicidade das dispersões coloidais pela sua carga aniônica, visto que partículas com perfil catiônico podem interferir na capacidade de atravessar membranas celulares carregadas negativamente e provocar danos celulares por propiciar o rompimento de membrana celular, conforme ilustra a Figura 4.5 [207, 208]. Esse resultado se

torna extremamente interessante uma vez que o objetivo do presente trabalho se destina a aplicações biológicas.

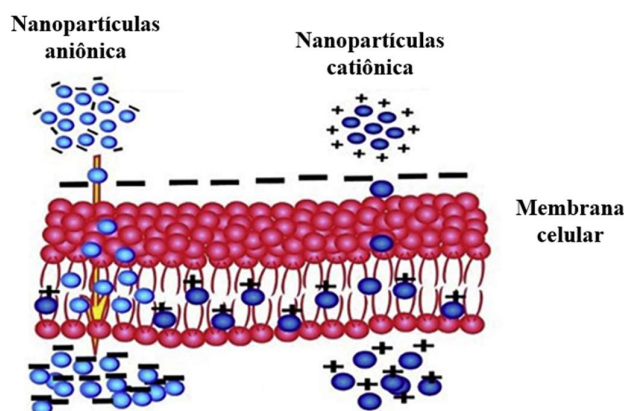


Figura 4.5: Permeabilidade da membrana celular. Adaptada de [209].

4.1.3 Espectroscopia de fotoluminescência

A espectroscopia de fotoluminescência foi realizada a fim de avaliar se as AuNPs sintetizadas por PLA em água apresentam algum sinal de luminescência, uma vez que esse sinal pode ser problemático para as análises de cunho biológico. Para isso, foi realizada a análise sobre a dispersão coloidal de AuNPs e, também, sobre o material transparente após o processo de precipitação das nanopartículas, o qual é constituído de *clusters*.

A análise se deu sobre a amostra de AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas por PLA em ar ambiente. Como é reportado na tese do TAHIR, 2020 [38] se realizamos o procedimento de precipitação das AuNPs (conforme descrito no material suplementar A.10) de modo que as nanopartículas maiores irão se precipitar, sobrando apenas um material transparente composto de *clusters*, os quais apresentam características fotoluminescentes. Nesse sentido, nós avaliamos a fotoluminescência medindo o espectro de excitação e emissão para depois, eventualmente, avaliar eventuais sobreposições sinais de fotoluminescência nos ensaios biológicos baseados em fotoluminescência.

Para a análise foi realizado o espectro de emissão, o qual mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, e obtém-se fixando o comprimento de onda de excitação. O espectro de emissão das

amostras obtidas quando excitadas com laser em 315nm, mostrou, respectivamente, uma banda de emissão com máximo centrado em 417nm (Figura 4.6). O resultado encontrado está de acordo com a literatura em que é reportado a existência entre 410 e 440nm. Além do mais, decidimos excitar nesta região, pois foi retratado que dispersões com estruturas luminescentes podem produzir espectro de emissão próximo a 410nm [38].

A fim de identificar a presença de *cluster* fotoluminescentes produzido por PLA em água realizamos a espectroscopia de fotoluminescência diretamente sobre a amostra de AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas por PLA em ar ambiente. Para tanto, realizou-se, também, o espectro de emissão o qual constatou a ausência do sinal de fotoluminescência (Figura 4.6). O fato de não ser possível observar nada é coerente, porque há uma transição interbanda, isto é, absorção da radiação na região espectral em torno de 400nm.

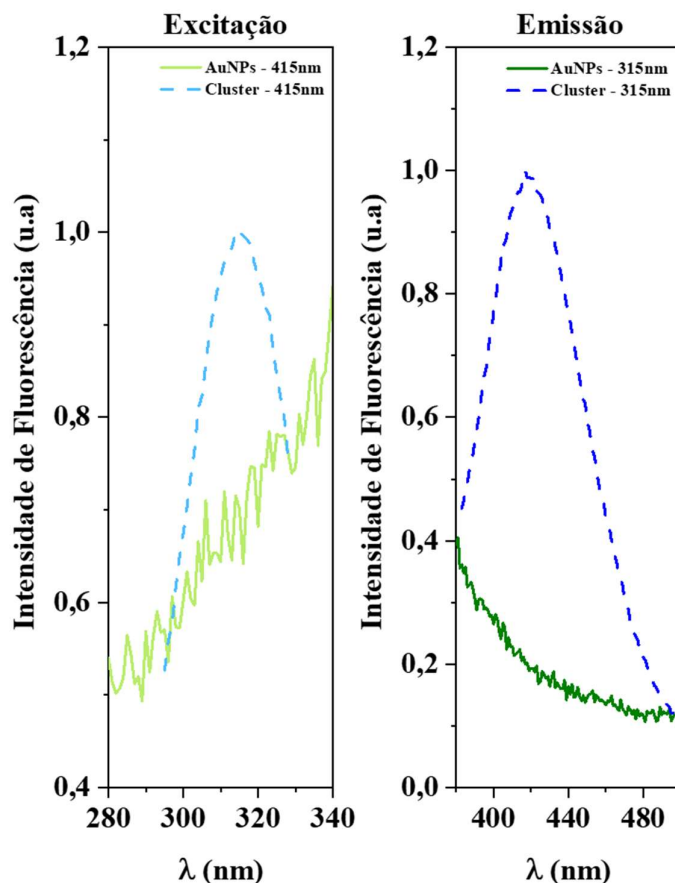


Figura 4.6: Espectro de fotoluminescência do *cluster* obtido a partir da dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH (linha pontilhada). Espectro de fotoluminescência da dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH (linha sólida).

Mediante do controle realizado a fim de investigar o sinal de luminescência das AuNPs produzidas por PLA em água, podemos concluir que não foi observado esse sinal. Portanto, não foi possível identificar sinal fotoluminescentes nas dispersões coloidais de AuNPs utilizadas no presente trabalho.

4.1.4 Espectroscopia Raman

Foi realizada uma investigação para saber quais são as condições experimentais em que aparece o pico na região espectral $2120 \sim 2124\text{cm}^{-1}$ no espectro SERS, o qual está associado ao Au-carbonil [119], sinalizando, portanto, a presença de monóxido de carbono que, conseqüentemente, pode implicar em possíveis efeitos terapêuticos. Para obter o espectro SERS precisamos manter a ressonância plasmônica, portanto, as AuNPs foram depositadas em gotas sobre um substrato. Nesse sentido, a dispersão coloidal de AuNPs feitas em ar foram secas em temperatura ambiente e em diferentes temperaturas (40°C , 80°C e 110°C), enquanto a dispersão coloidal de AuNPs feitas em atmosfera controlada com N_2 foram secas à 40°C . Também foi realizado o estudo variando o número de gotas (4, 8 e 12 gotas) depositadas sobre o substrato. Ademais, foi realizado um estudo sobre o espectro Raman, e, para isso, as AuNPs foram liofilizadas a fim de se obter um pó, logo, nesse caso não teremos efeito de ressonância plasmônica.

Dessa forma, para obter o espectro SERS da dispersão coloidal de AuNPs com 4mM de NaOH feitas em ar, inicialmente, depositamos 6 gotas em 3 substratos de vidro distintos, os quais foram secos nas respectivas temperaturas 25°C (temperatura ambiente), 40°C , 80°C e 110°C . Nessa condição, foi possível verificar uma linha em torno de 2124cm^{-1} para as amostras secas em 40°C e 80°C , enquanto nas amostras secas em 25°C e 110°C não foi possível observar esse pico (Figura 4.8). Dessa forma, foi possível observar que à medida que a amostra é seca em temperaturas mais elevadas o sinal da frequência em torno de 2124cm^{-1} é reduzido.

Além disso, foi estudado as AuNPs em ausência de dióxido de carbono (CO_2), e para tanto a síntese de AuNPs se deu em atmosfera controlada com injeção de N_2 cuja finalidade é retirar, justamente, o CO_2 da amostra. Como foi visto que as amostras secas à 40°C apresentaram o sinal típico do Au-carbonil, então,

utilizamos essa temperatura para esse estudo. Sendo assim, 6 gotas da dispersão coloidal das AuNPs com 4mM de NaOH em atmosfera controlada de N_2 foram depositadas no vidro e secas a 40°C , porém, não foi possível observar nenhum pico na região espectral $2120 \sim 2124\text{cm}^{-1}$ no espectro SERS (Figura 4.8). A Figura 4.7 mostra uma das regiões analisadas da amostra depositada sobre o substrato de vidro. Na Tabela 4.5 são reportadas as frequências relacionadas as AuNPs com 4mM de NaOH secas nas temperaturas 40°C , 80°C e 110°C e as AuNPs com 4mM de NaOH em atmosfera controlada de N_2 com vácuo e secas a 40°C .

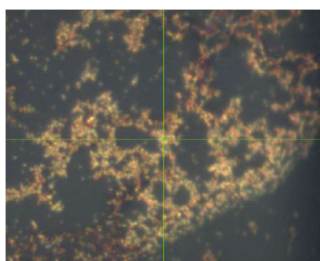


Figura 4.7: Imagem obtida por meio do espectrômetro Raman Xplora confocal da HORIBA das AuNPs sintetizados por PLA feita em ar com $C_{\text{NaOH}} = 4,00 \text{ mmol/L}$ seca em ar e depositadas no vidro.

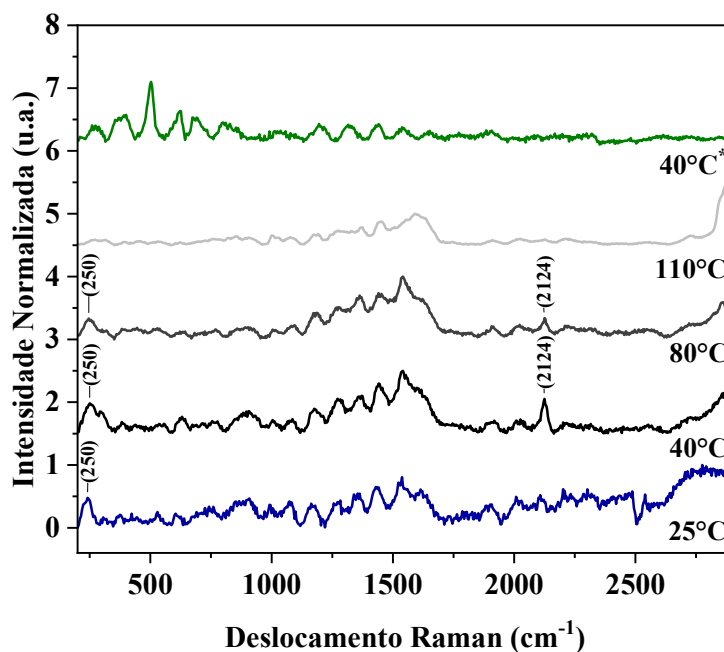


Figura 4.8: Resposta SERS das AuNPs sintetizados por PLA com $C_{\text{NaOH}} = 4,00 \text{ mmol/L}$ seca em temperaturas distintas. O comprimento de onda de excitação para a análise foi igual a 638nm.
*AuNPs com 4mM de NaOH em atmosfera controlada de N_2 .

Tabela 4.5: Frequências SERS das AuNPs sintetizadas em ar e em atmosfera controlada com N₂

AuNP com 4 mM NaOH						AuNPs com 4mM de NaOH em atmosfera controlada com N ₂ - com vácuo	
<i>Depositadas no vidro</i>						<i>Depositado no vidro</i>	
40 °C		80°C		110 °C		40°C	
244,7	VERY STRONG	244,7	MEDIUM	550,4	WEAK	1003,71	WEAK
529,9	VERY WEAK	550,4	VERY WEAK	779,9	WEAK	1077,82	WEAK
634,0	MEDIUM	773,3	VERY WEAK	856,9	WEAK	1163,32	MEDIUM
919,2	WEAK	905,3	WEAK	905,3	MEDIUM	1271,77	MEDIUM
1016,7	VERY WEAK	1037,3	WEAK	1002,8	MEDIUM	1354,98	MEDIUM
1093,0	WEAK	1086,4	MEDIUM	1079,1	MEDIUM	1437,21	MEDIUM
1183,2	MEDIUM	1183,2	MEDIUM	1176,6	MEDIUM	1537,69	WEAK
1274,1	MEDIUM	1288,0	MEDIUM	1274,1	MEDIUM	1889,08	WEAK
1364,3	MEDIUM	1364,3	MEDIUM	1370,9	MEDIUM	2004,62	WEAK
1440,5	MEDIUM	1440,5	MEDIUM	1454,4	MEDIUM	2104,07	WEAK
1538,0	MEDIUM	1538,0	MEDIUM	1551,9	WEAK	2208,96	VERY WEAK
1899,5	WEAK	1906,8	WEAK	1600,3	WEAK		
2024,8	WEAK	2010,9	WEAK	1906,8	WEAK		
2122,7	MEDIUM	2122,4	WEAK	2003,6	WEAK		
2212,5	WEAK	2219,1	WEAK	2205,2	WEAK		
2705,9	VERY WEAK	2859,2	MEDIUM	2719,9	WEAK		
2851,8	MEDIUM			2879,7	VERY STRONG		
2921,5	MEDIUM			2914,9	VERY STRONG		
				3053,5	WEAK		

Dados destacados correspondem ao **ouro-carbonil**.

Para estudar a eventual contribuição do ambiente foi feita a secagem das amostras em vácuo e, além disso, investigamos a relação do número de gotas com o sinal do pico 2124cm^{-1} . Portanto, realizou-se a deposição de 4, 8 e 12 gotas da dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH feitas em atmosfera ambiente no substrato de silício a qual foi seca em vácuo à 40°C , uma vez que no estudo anterior vimos que essa temperatura foi a mais adequada para observar o pico 2124cm^{-1} . Nessa condição, foi possível observar a presença do pico 2124cm^{-1} para a amostra com 4, 8 e 12 gotas cuja intensidade do sinal diminui à medida que se aumenta a quantidade de material depositado, isto é, com o acréscimo das gotas, conforme mostra a Figura 4.9. Tal comportamento, evidencia o efeito SERS, de modo que a ressonância plasmônica se matem em regiões onde não há acumulação de nanopartícula.

A detecção por SERS do monóxido de carbono (CO) adsorvido no nanomaterial de Au aponta para uma atividade catalítica das NPs que sintetizamos por PLA de alvos de ouro. Na Figura 4.9, também, é possível observar os modos Raman coletivos do carbono sp^2 , espécies de carbono amorfo, sobrepostos a várias vibrações moleculares resultantes da banda G e D. A banda D (1200 a 1400cm^{-1}) está associada a imperfeições estruturais ou defeitos criados pela inserção de grupos oxigenados no plano de carbono, enquanto a banda G (1500 a 1600cm^{-1}) está associada à vibração no plano dos átomos de carbono sp^2 [210]. Ademais, é possível observar as bandas 2800 a 3000cm^{-1} típicas do grupo metil na região [211] (Figura 4.9), o qual é constituído de apenas um carbono ligado a três hidrogênios [63].

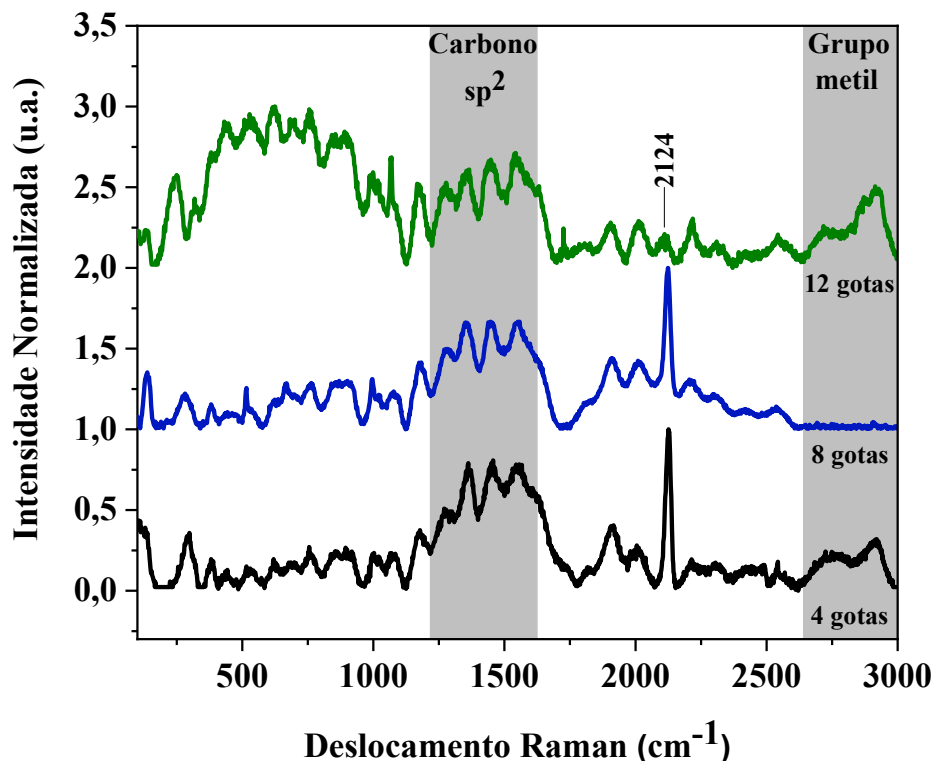


Figura 4.9: Resposta SERS das AuNPs sintetizados por PLA em atmosfera ambiente com $C_{\text{NaOH}} = 2,00 \text{ mmol/L}$ depositadas sobre o substrato de silício e seca em forno a vácuo à 40°C . O comprimento de onda de excitação para a análise foi igual a 638nm .

Embora tenhamos feito o vácuo na síntese da AuNPs em atmosfera controlada de N_2 ou até mesmo secado as AuNPs em vácuo, ainda assim, é possível ter espécies carbônicas sólidas, uma vez que pelo equilíbrio químico da CO_2 mostrado no gráfico de Bjerrum, Figura 4.10, fica evidente que não é possível retirar espécies carbônicas sólidas ao menos que o pH seja menor do que 4. De acordo com o equilíbrio da CO_2 , em pH 4 quase todo CO_2 estará na forma de molécula livre, enquanto, em pH 13 o CO_2 estará dissolvido na forma de carbonato (Figura 4.10). Então, o aumento do pH resultará em menor concentração de CO_2 na fase gasosa. Dessa forma, o ponto de equilíbrio químico entre as formas gasosas e solúveis no sistema ocorrerá em pH 6,52 (pH correspondente da água ultra pura, utilizada para síntese por PLA das AuNPs). Sendo assim, a adição do N_2 pode retirar o CO_2 na forma de molécula livre da amostra, entretanto, não é possível retirá-lo na forma de carbonato e de bicarbonato, segundo o equilíbrio químico da CO_2 , conforme mostra o gráfico de Bjerrum (Figura 4.10). Então, não é surpreendente se identificarmos as mesmas

frequências em uma amostra realizada em vácuo e outra sem vácuo, pois sempre teremos uma pequena porcentagem de um desses elementos.

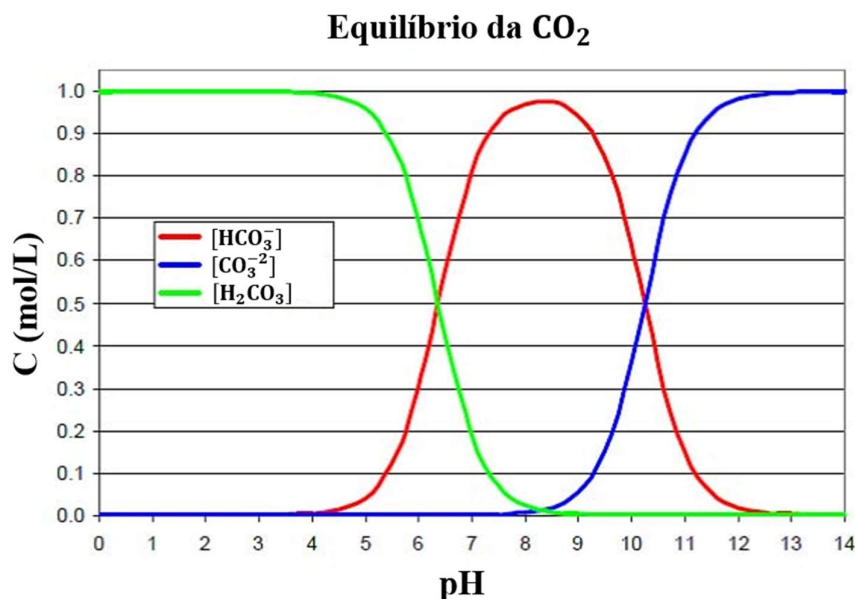


Figura 4.10: Gráfico de Bjerrum mostrando as proporções relativas do equilíbrio químico entre ácido carbônico (em verde), bicarbonato (em vermelho) e o carbonato (em azul). Adaptado de [212].

Para o espectro Raman, a dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas em atmosfera ambiente foi liofilizada. O pó obtido a partir da liofilização foi apoiado sobre um substrato de vidro e compactado com uma lâmina de vidro de microscópio. No espectro Raman obtido não foi possível observar a presença da linha espectral em torno de 2124cm^{-1} , entretanto, foi possível observar um pico na região 1073cm^{-1} , que de acordo com a literatura está associada à presença de carbonato [213] (Figura 4.11).

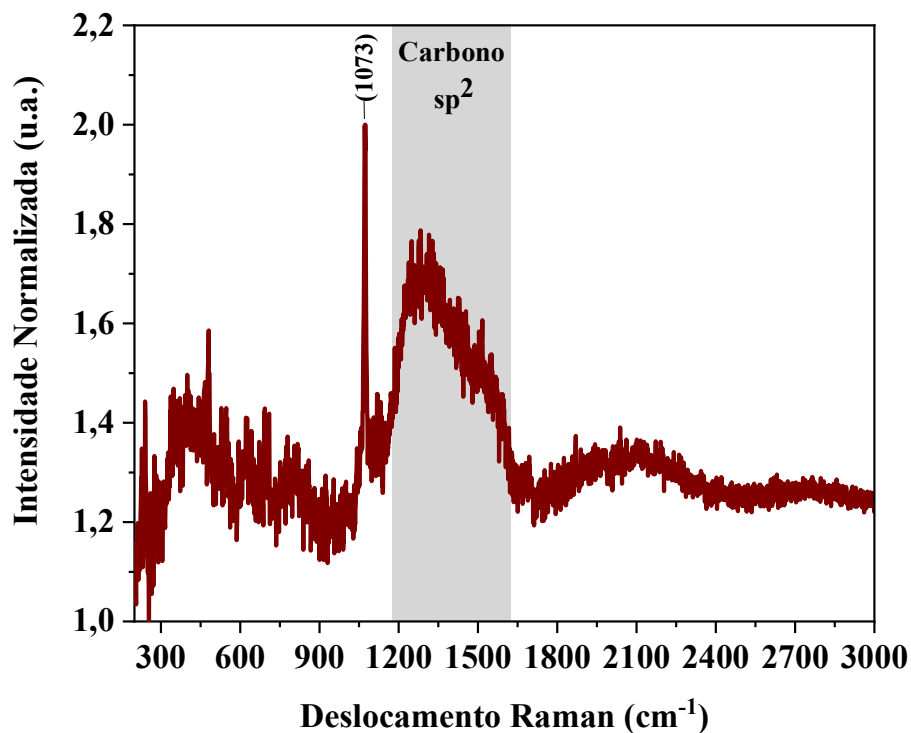


Figura 4.11: Espectro Raman das AuNPs sintetizados por PLA em atmosfera ambiente com $C_{\text{NaOH}} = 2,00 \text{ mmol/L}$ e liofilizadas. Nessa amostra não foi possível observar a frequência 2124 cm^{-1} típica do Au-carbonil, entretanto, foi possível identificar uma frequência na região 1073 cm^{-1} . O comprimento de onda de excitação para a análise foi igual a 785 nm .

Em observância aos resultados obtidos, é possível concluir que foi possível detectar a presença do ouro-carbonil, carbonato e a banda G e D nas AuNPs que produzimos por PLA em água. Ademais, eventualmente, outros compostos podem ser gerados no processo de redução da CO_2 durante a ablação os quais podem ser relacionados as demais linhas presentes nos espectros SERS e Raman.

4.1.5 Difração de raios X (DRX)

Para verificar a componente cristalina, seja do ouro ou de algum outro produto que deriva das reações químicas durante a ablação foi realizado a difração de raios X (DRX) das AuNPs. Para essa análise foram preparadas as nanopartículas de ouro com $0,5 \text{ mM}$, 1 mM , 2 mM , 4 mM e 8 mM de NaOH , todas sem a presença do Pluronic® F127 e sintetizadas em atmosfera ambiente. Essa análise foi realizada sem a presença do Pluronic® F127, uma vez que ele apresenta um pico característico em torno de $19,5^\circ$ e $23,8^\circ$, já reportado pela literatura [214].

Foi possível verificar que à medida que aumentava a concentração de NaOH na síntese das nanopartículas de ouro as fases obtidas pela caracterização por DRX se tornavam mais complexas (Figura 4.12). Em uma análise preliminar verificamos que as reflexões de Bragg das AuNPs apresentaram correspondência com os picos de difração do ouro metálico em relação aos planos (111), (002), (220) e (311), indexados, respectivamente, a $2\theta = 38,26^\circ$, $44,45^\circ$, $64,74^\circ$ e $77, 71^\circ$.

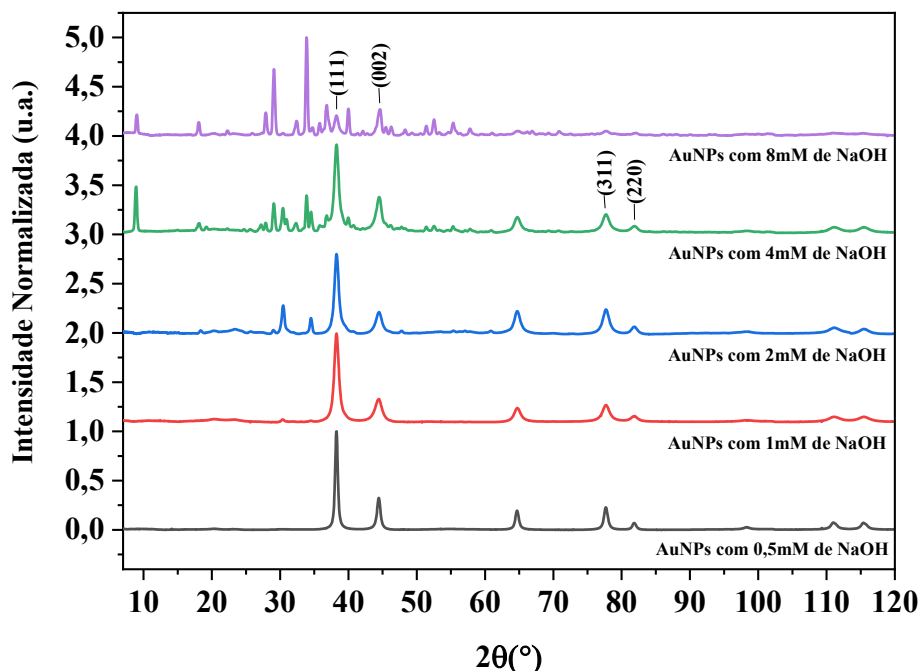


Figura 4.12: Padrão de DRX das amostras de AuNPs com diferentes concentrações de NaOH.

Foi realizado o DRX das nanopartículas de ouro com 8mM de NaOH dialisada e solução de NaOH com concentração igual a 8mM, para fim de comparação e estudo das fases encontradas. Nesse estudo, foi possível identificar correlação das fases entre as amostras AuNPs com 8mM sem diálise e a solução de NaOH, e, fases mais intensas do ouro na amostra de AuNPs com 8mM de NaOH quando feita a diálise, conforme mostra a Figura 4.13.

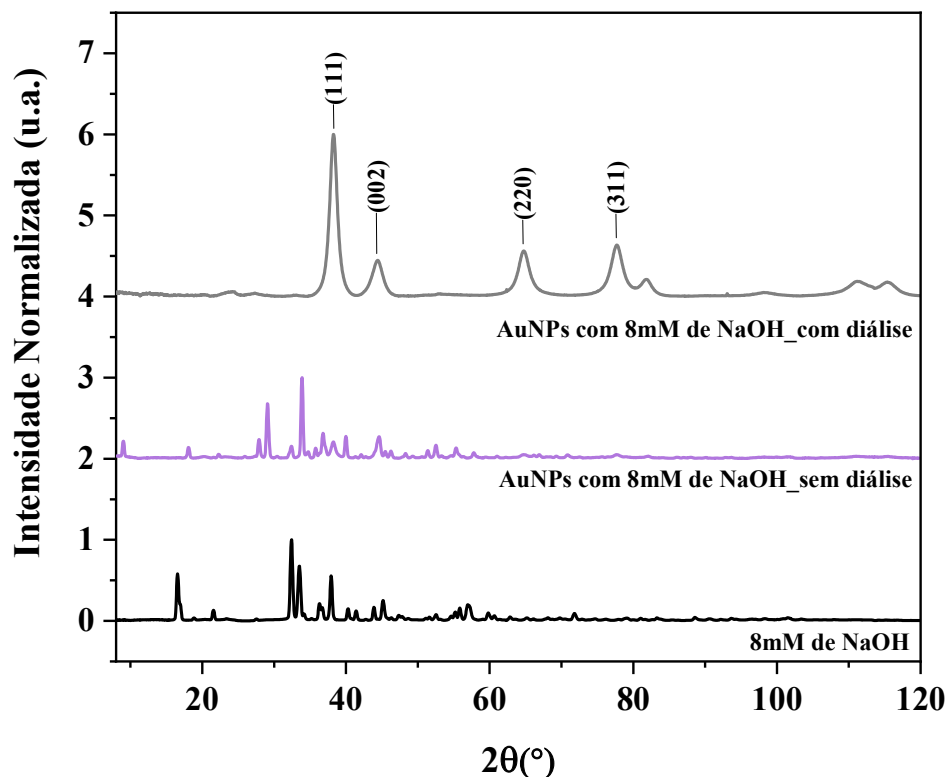


Figura 4.13: Padrão de DRX da solução de NaOH (8mM) e das amostras com e sem diálise das AuNPs com 8mM de NaOH.

Diante da complexidade das amostras foi necessário realizar um estudo mais detalhado com o auxílio do Prof. Dr. Alexandre Cuin, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), o qual forneceu o mapeamento das fases das amostras, e, para isso foi escolhida a amostra referente às AuNPs com 4mM de NaOH. Através dos resultados obtidos foi possível identificar, também, a presença das fases acetato de sódio (NaAc), bicarbonato de sódio (NaHcolite) e carbonato de sódio dihidratado (Trona), além da fase de ouro, conforme mostra a Figura 4.14. No mapeamento da amostra de AuNPs com 4mM de NaOH feita em atmosfera ambiente não foi detectado a fase relacionada ao Au_2O_3 , o qual é reportado na literatura no plano (222) em $2\theta = 52,53^\circ$, para AuNPs sintetizadas por PLA em água [215].

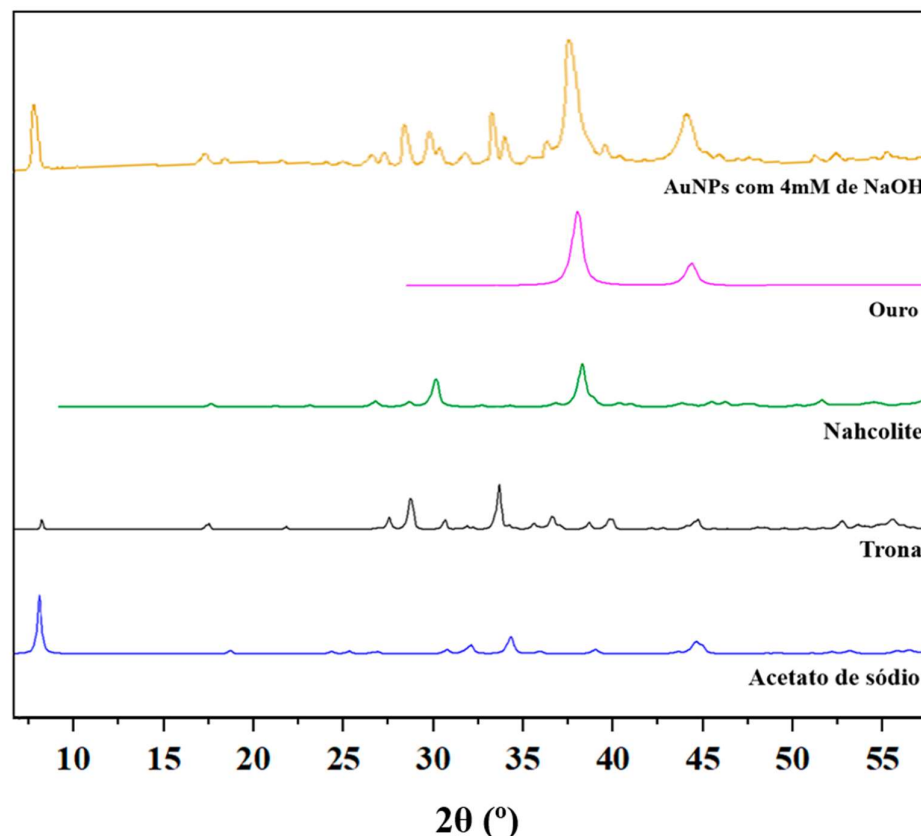


Figura 4.14: Padrão de DRX da AuNPs com 4mM de NaOH sintetizadas por PLA em água e em ar (em amarelo) e as fases encontradas no mapeamento da amostra, sendo elas: ouro (em rosa), Nahcolite (em verde), Trona (em preto) e acetato de sódio (em azul).

A partir dessa análise foi possível realizar o mapeamento das fases para as AuNPs com 4mM de NaOH sintetizadas em ar, e sua respectiva correspondência aos elementos de acordo com o *database* disponibilizado pelo JCPDS conforme mostra a Tabela 4.6.

Diante dos dados obtidos podemos verificar a presença de fases relacionadas a presença de acetato de sódio, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio, além, é claro, do ouro em nossas AuNPs sintetizadas por PLA em água. Esses resultados estão em consonância com os resultados obtidos por espectroscopia SERS e Raman. Todavia, a presença de Au_2O_3 não foi detectada, e tal fato pode estar correlacionado a uma quantidade baixa o suficiente para não ser possível detectar por essa técnica.

Tabela 4.6: Fases encontradas nas AuNPs com 4mM de NaOH

Intensidade	2 θ (°)	Hkl	d(hkl) nm	Elemento	Código de referência
1,94	8,89	0 1 0	0,99	acetato de sódio (NaAc)	00-001-0050
0,36	18,11	4 0 0	0,49	carbonato de sódio dihidratado (Trona)	00-011-0643
0,12	19,20	0 1 1	0,46	acetato de sódio (NaAc)	00-001-0050
4818,46	27,10	1 -1 -1	0,33	carbonato de sódio dihidratado (Trona)	00-011-0643
0,64	27,55	1 1 0	0,32	acetato de sódio (NaAc)	00-001-0050
1,21	29,08	3 1 0	0,31	carbonato de sódio dihidratado (Trona)	00-011-0643
1,48	30,47	1 -1 -2	0,29	bicarbonato de sódio (Nahcolite)	00-001-0909
0,35	32,29	0 3 1	0,27	acetato de sódio (NaAc)	00-001-0050
1,36	33,87	5 -1 -1	0,26	carbonato de sódio dihidratado (Trona)	00-011-0643
8,60	38,26	1 1 1	0,23	ouro (Au)	00-001-1172
3,74	44,46	0 0 2	0,20	ouro (Au)	00-001-1172
0,08	47,78	1 -4 -2	0,19	bicarbonato de sódio (Nahcolite)	00-001-0909
0,16	51,40	1 3 2	0,17	bicarbonato de sódio (Nahcolite)	00-001-0909
0,25	55,34	7 -1 -5	0,16	carbonato de sódio dihidratado (Trona)	00-011-0643
0,13	57,82	2 2 2	0,16	carbonato de sódio dihidratado (Trona)	00-011-0643
0,06	64,74	2 2 0	0,14	ouro (Au)	00-001-1172
2,02	77,71	3 1 1	0,12	ouro (Au)	00-001-1172

Em que 2 θ é o ângulo de Bragg, hkl são os planos cristalinos, d(hkl) é a distância interplanar. Tais dados correspondem aos dados experimentais obtidos a partir da amostra de AuNPs com 4mM de NaOH sintetizadas em ar. A identificação dos elementos se deu com base ao *database* JCPDS conforme indicado nos códigos de referência.

4.1.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A fim de avaliar as dimensões e morfologia das nanopartículas foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As imagens MET também foram realizadas com o objetivo de avaliar se há algum padrão de difração diferente da estrutura do ouro, por meio da difração de raios X.

A partir da análise detalhada das AuNPs pela microscopia MET, realizou-se a distribuição de tamanho das AuNPs, sendo estimado os raios de $1,7 \pm 0,4 \text{ nm}$, $1,9 \pm 0,2 \text{ nm}$ e $2,6 \pm 0,5 \text{ nm}$, conforme ilustra a Figura 4.15. Ademais as medidas realizadas no MET mostram que essas nanopartículas são todas esféricas, estando de acordo com as previsões obtidas por UV-Vis.

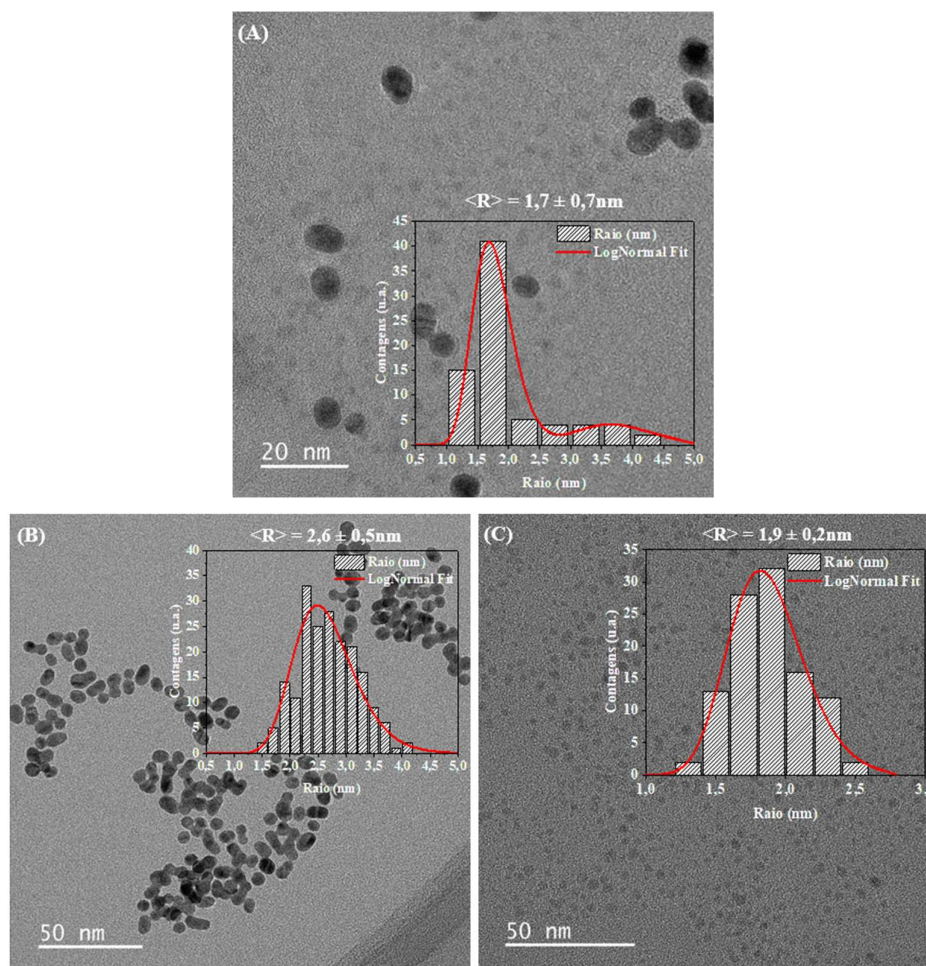


Figura 4.15: Imagens obtidas por microscopia de transmissão (MET) das AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas em ar por PLA em água. (A) Distribuição bimodal dos tamanhos das AuNPs. (B) AuNPs com raio de aproximadamente $2,6 \pm 0,5 \text{ nm}$. (C) AuNPs com raio de aproximadamente $1,9 \pm 0,2 \text{ nm}$.

Para complementar os experimentos de MET e evidenciar a composição das nanopartículas foram utilizadas as técnicas de EDS, a qual constatou a presença de átomos de O (oxigênio) e Na (sódio) além do Au (Figura 4.16). Os resíduos de sódio (Na) são provenientes da solução de hidróxido de sódio (NaOH) que usamos durante a ablação (Figura 4.16).

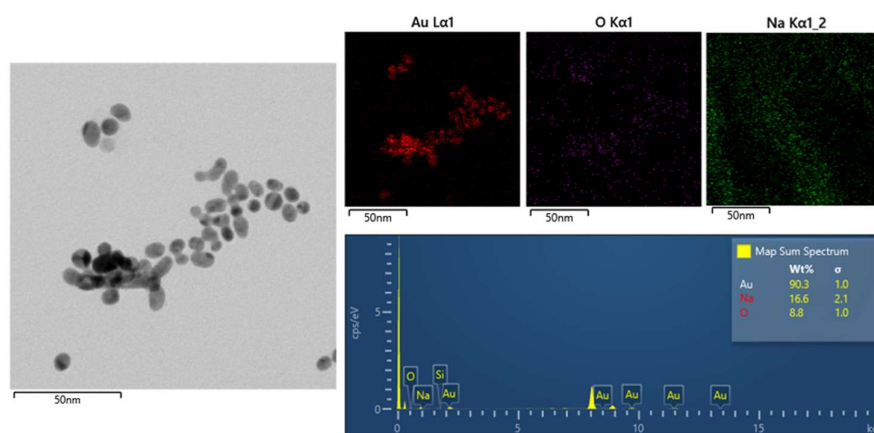


Figura 4.16: Espectroscopia por Energia dispersiva de Raios X (EDS) das nanopartículas de ouro sintetizada por PLA. Identificação dos elementos Au, Na e O. A tensão de aceleração de elétrons foi mantida em 200kV.

A partir das imagens obtidas por microscopia de transmissão (MET) foi possível encontrar as distâncias interplanares (Figura 4.17), que são típicas do ouro metálico, com as distâncias próximas a 0,20nm e 0,23nm correspondendo ao plano (002) e (111) [63, 119].

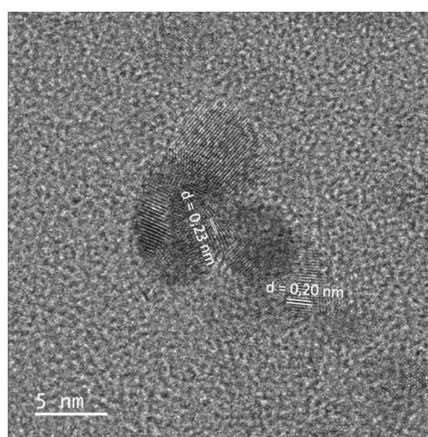


Figura 4.17: Distância interplanar das AuNPs com 2mM de NaOH sintetizada em ar por PLA em água, obtidas por meio das imagens de microscopia de transmissão (MET).

De acordo com os resultados obtidos por MET, verificamos que as AuNPs que produzimos apresentam morfologia esférica com o raio médio da ordem de, aproximadamente, 2nm o que está em concordância com o resultado encontrado por meio da técnica UV-Vis. Além disso, identificamos, por meio de EDS, a presença de ouro, oxigênio e sódio nas AuNPs produzidas por PLA em água, assim como, verificamos a distância interplanar característica do ouro metálico.

4.1.7 Conclusão segundo as características físico-químicas das AuNPs

As AuNPs que produzimos por ablação a laser pulsado em água feitas em ar e em atmosfera controlada com N₂ apresentaram estabilidade tanto na presença de Pluronic® F127 quanto na ausência de Pluronic® F127, mesmo depois de semanas após a síntese. Além do mais, foram confirmadas as propriedades plasmônicas para todas as nanopartículas sintetizadas por PLA em água e sintetizadas via química, com extinção óptica, respectivamente, em torno de 510nm e 520nm. Por meio das imagens obtidas por MET concluímos que as nanopartículas que produzimos apresentam característica esférica e raio médio de, aproximadamente, 2nm o que está em concordância com o que encontramos com a relação aos resultados de UV-Vis, por meio da divisão entre a absorção correspondente ao λ_{LSPR} e ao λ_{440} .

A investigação referente a componente cristalina derivada das reações químicas durante a ablação, por meio da difração de raios X (DRX), identificou a presença do acetato de sódio, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio. Em nossa hipótese, o acetato de sódio está correlacionado ao processo CO₂RR. Quando realizamos a PLA em água e em atmosfera ambiente temos a presença da CO₂, e esta foi detectada por meio do SERS onde foi possível detectar as bandas D e G, além do pico na região espectral 2124cm⁻¹ que é típico do Au-carbonil. Ademais, verificamos que a condição para o pico 2124cm⁻¹ ser observável ocorre quando se deposita entre 4 e 8 gotas da amostra sobre um substrato, e que ela seja seca à 40°C. Todavia, quando realizamos PLA em água e em atmosfera controlada com N₂ não conseguimos observar o pico 2124cm⁻¹. Na medida Raman identificou-se a presença de carbonato por meio da presença do pico na região 1073cm⁻¹.

A partir dos resultados obtidos por meio da espectroscopia de fotoluminescência não foi possível observar a presença de material luminescente que possa interferir nos ensaios biológicos. Com o potencial Zeta identificamos que todas as AuNPs sintetizadas por PLA em água apresentam carga negativa. Ademais, observou-se que quando temos a presença do Pluronic® F127 a carga das AuNPs diminui. Essa característica aniônica é extremamente interessante do ponto de vista celular, uma vez que é reportado pela literatura que partículas catiônicas podem causar danos na membrana celular. A luz dos resultados obtidos pode apresentar um perfil interessante para aplicações biológicas, podendo, se comportar como moléculas liberadoras de óxido de carbono (CORMs). Nesse sentido, realizaram-se ensaios biológicos nos quais serão apresentados no item 4.2.

4.2 Análise biológica

4.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Índice de Polidispersão (PDI)

Com a finalidade de estudar as estabilidades das dispersões coloidais das AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH, sintetizadas por PLA em atmosfera ambiente, na presença do Pluronic® F127 em meio de cultura utilizou-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Nesse sentido, foi investigado se há aglomeração ou precipitação das AuNPs em meio de cultura. Por meio da análise de DLS, também foi investigado a homogeneidade ou a heterogeneidade da amostra através do índice de polidispersão (PDI).

A técnica DLS foi utilizada para investigar a dispersão das AuNPs em meio de cultura DMEN-HIGH D5648-1L (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose*, Sigma-Aldrich®) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™), meio no qual utilizamos no cultivo celular da RAW 264.7. Os resultados mostraram que diante da comparação das NPs na ausência e na presença do meio de cultura, os diâmetros hidrodinâmicos das AuNPs aumentam em meio de cultura, apontando para uma possível aglomeração das AuNPs, fato que, provavelmente, está atribuído a uma menor estabilidade das NPs no meio e a presença de proteínas oriundas do meio de cultura celular a qual pode implicar em uma adsorção espontânea e inespecífica na superfície das NPs. Esse estudo foi

investigado, por meio de número de partícula por diâmetro hidrodinâmico (Figura 4.18). A distribuição numérica demonstra o número de partículas que correspondem a um determinado tamanho, além do mais essa distribuição é recomendada para amostras compostas por partículas menores [216]. Ademais, não foi observada a precipitação das AuNPs em meio de cultura.

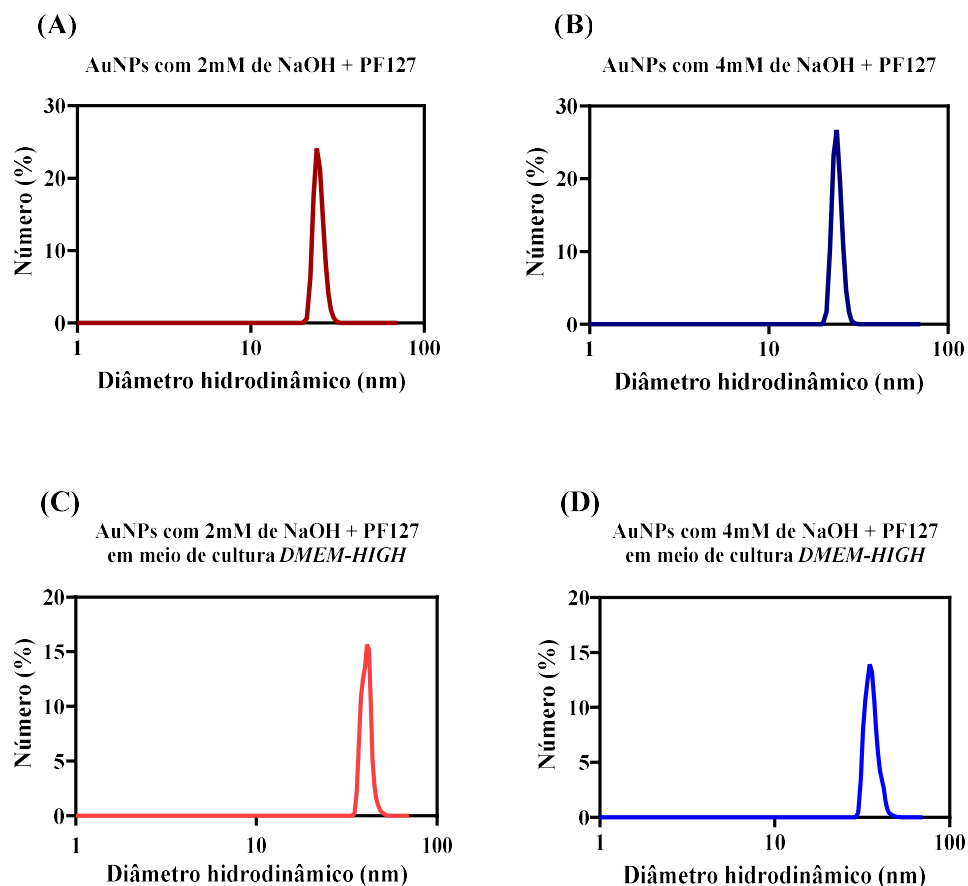


Figura 4.18: Dados obtidos por meio da análise de DLS para uma distribuição do número por diâmetro hidrodinâmico das AuNPs produzidas por PLA feitas em ar ambiente. As imagens (A) e (B) correspondem, respectivamente a distribuição para AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH + PF127. As imagens (C) e (D) correspondem, respectivamente a distribuição para AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH + PF127 em meio de cultura *DMEM-HIGH*.

Através da análise de DLS, também foi possível obter o índice de polidispersão (PDI), o qual retrata a homogeneidade ou a heterogeneidade da amostra. Neste quesito, quanto menor o valor de PDI, mais homogênea é a população de NPs da amostra, enquanto maiores valores de PDI indicam maior heterogeneidade. Os valores de PDI das amostras AuNPs com 2mM com NaOH e

Pluronic® F127 e as AuNPs com 2mM com NaOH e Pluronic® F127 em meio de cultura apresentaram, em geral, valores próximos a 0,3 indicando formação de sistemas monodispersos, a dispersão coloidal de AuNPs com 4mM de NaOH com Pluronic® F127 apresentou valor em torno de 0,5 indicando, neste caso, maior heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão em relação as outras, mas ainda sim pode ser classificada como uma amostra monodispersas, uma vez que o PDI varia de 0 a 1 no software Zetasizer, estabelecendo que valores maiores do que 1 indicam uma distribuição polidispersa da amostra (Figura 4.19).

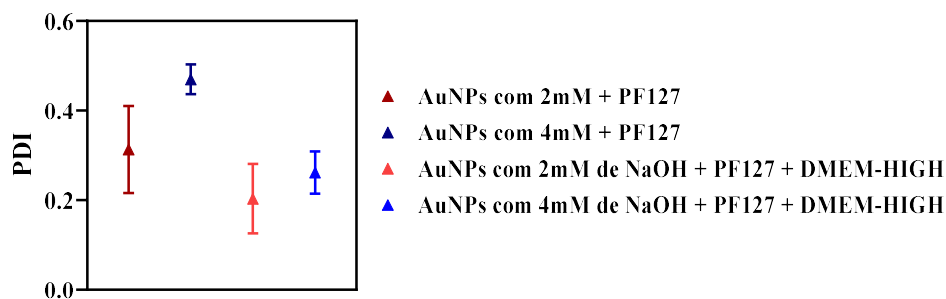


Figura 4.19: Índice de polidispersão (PDI) das AuNPs produzidas por PLA feitas em atmosfera ambiente na ausência e presença do meio de cultura DMEM-HIGH.

A partir da investigação com relação a interação do meio de cultura com as AuNPs sintetizadas por PLA em água por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) verificamos que houve um aumento do raio hidrodinâmico dessas nanopartículas no meio de cultura. O meio de cultura contém uma ampla gama de moléculas menores (por exemplo, íons) e maiores (por exemplo, vitaminas) resultando na adsorção dessas moléculas pelas AuNPs, alterando as propriedades da superfície e os tamanhos [216]. Isto torna-se particularmente evidente para o nosso caso uma vez que o meio foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) enriquecido com proteínas. A adsorção de moléculas de proteína maiores pode mostrar um aumento do raio hidrodinâmico para as nanopartículas dispersas [216]. Vale ressaltar que o raio hidrodinâmico não é a dimensão da nanopartícula, conforme reportado nos trabalhos [217, 218] a técnica DLS mede o raio hidrodinâmico das nanopartículas em suspensão, que é sempre maior que o núcleo metálico. Os valores de PDI das amostras analisadas indicaram a formação de sistemas monodispersos.

4.2.2 Viabilidade celular

A fim de avaliar a citotoxicidade das nanopartículas em relação aos macrófagos RAW 264.7 em distintas concentrações (0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL) e tempos (24h, 48h e 72h) foi realizado ensaio por MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). A Figura 4.20 mostra as células tratadas com as AuNPs em todas as condições propostas no presente trabalho antes de serem expostas ao MTT e ao DMSO e depois de serem expostas aos mesmos, nos tempos de 24h, 48h e 72h. A coloração roxa é um quantificador da viabilidade celular, uma vez que a redução do MTT pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e ao NADPH forma cristais de formazan com coloração característica roxa. Sendo assim, uma maior intensidade da coloração roxa maior é a viabilidade.

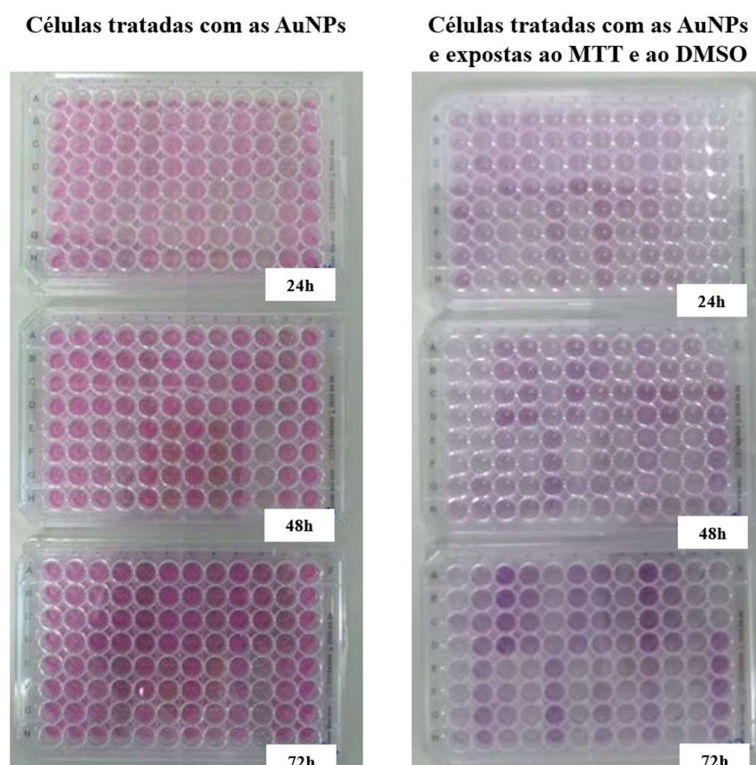


Figura 4.20: Células tratadas com as AuNPs e submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT.

Os resultados seguem adiante na Figura 4.21, na qual é possível observar uma redução significativa da atividade mitocondrial inicialmente, no tempo de

24h, para o tratamento com AuNPs com 2mM de NaOH sem Pluronic® F127 nas concentrações de 25µg/mL ($54,9\% \pm 16,2$) e 50µg/mL ($44,0\% \pm 11,0$). Enquanto, em 48h, houve redução para a concentração 50µg/mL com Pluronic® F127 ($38,8\% \pm 28,4$), além das condições 25µg/mL ($56,6\% \pm 11,7$) e 50µg/mL ($22,7\% \pm 9,1$) sem Pluronic® F127 para as AuNPs com 2mM de NaOH. No tempo de 72h, a redução da atividade mitocondrial se manteve para essas condições. As células tratadas com 25µg/mL ($54,8\% \pm 9,4$) e 50µg/mL ($5,4\% \pm 2,5$) de AuNPs com 4mM de NaOH com Pluronic® F127 tiveram redução da atividade mitocondrial, assim como as células tratadas com 10µg/mL ($30,7\% \pm 16,6$), 25µg/mL ($23,4\% \pm 10,5$) e 50µg/mL ($4,2\% \pm 2,3$) sem Pluronic® F127, em 24h. Em 48h e 72h a redução da atividade mitocondrial se manteve para tais condições.

As células tratadas com AuNPs via síntese química (Figura 4.22) apresentaram redução significativa da atividade mitocondrial de $3,7\% \pm 5$ e $6,4\% \pm 8,6$ para as respectivas condições 25µg/mL com Pluronic® F127 e 25µg/mL sem Pluronic® F127 no tempo de 24h. No tempo de 48h, esse tratamento teve contínua queda de atividade mitocondrial nas condições 25µg/mL com Pluronic® F127 ($-2,7\% \pm 0,3$), 10µg/mL sem Pluronic® F127 ($47,1\% \pm 6,3$) e 25µg/mL sem Pluronic® F127 ($0,1\% \pm 3,0$). Em 72h, a redução da atividade mitocondrial se manteve para essas condições. Vale ressaltar que no caso do tratamento das células com as AuNPs provenientes da síntese química não foi realizado o tratamento com a concentração igual a 50µg/mL, uma vez que o ICPMS para a dispersão coloidal de AuNPs mostrou uma concentração de ouro igual a 37,7mg/L.

Para as nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser em atmosfera controlada com N₂ (Figura 4.23) houve uma redução significativa da viabilidade para todos os tratamentos, com exceção das condições 10µg/mL com e sem Pluronic® F127, com os respectivos valores $70,0\% \pm 11,6$ e $81,5\% \pm 27,8$ para o tempo de 24h. Após o tempo de 48h a redução da atividade mitocondrial permaneceu para todos o tratamento com exclusão da condição 10µg/mL com Pluronic® F127 ($75,3\% \pm 13,5$). Por fim, em 72h, a redução da atividade mitocondrial se deu para todas as condições de tratamento.

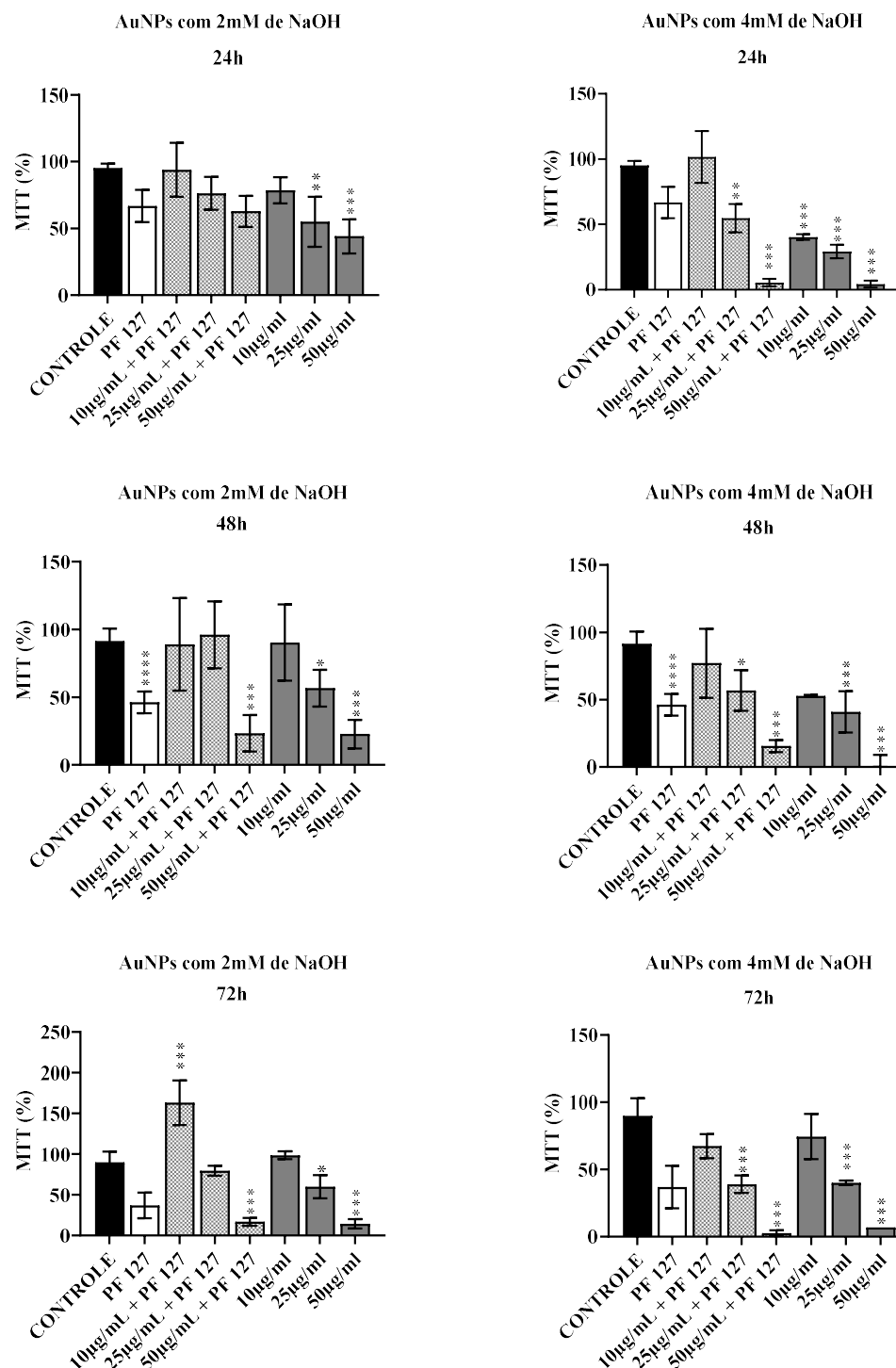


Figura 4.21: Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média normalizada dos dados brutos da leitura das absorvâncias a 570nm em relação ao controle, expresso em porcentagem $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$.

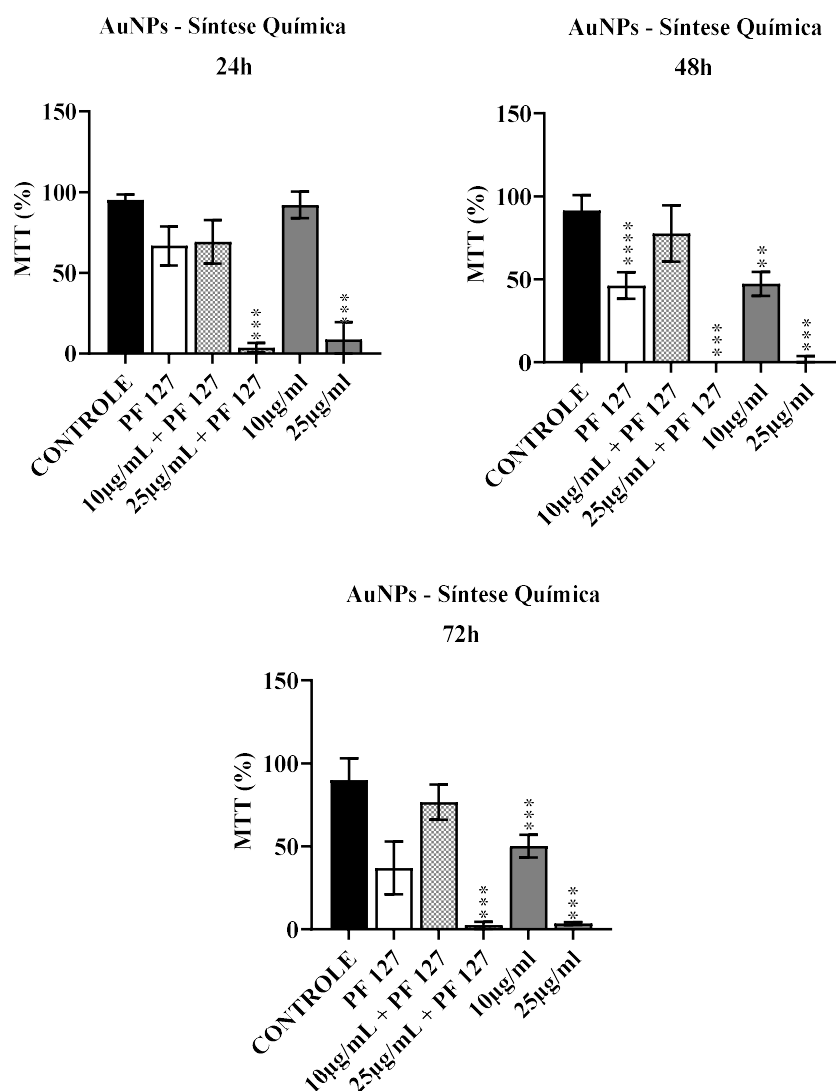


Figura 4.22: Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média normalizada dos dados brutos da leitura das absorvâncias a 570nm em relação ao controle, expresso em porcentagem $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$.

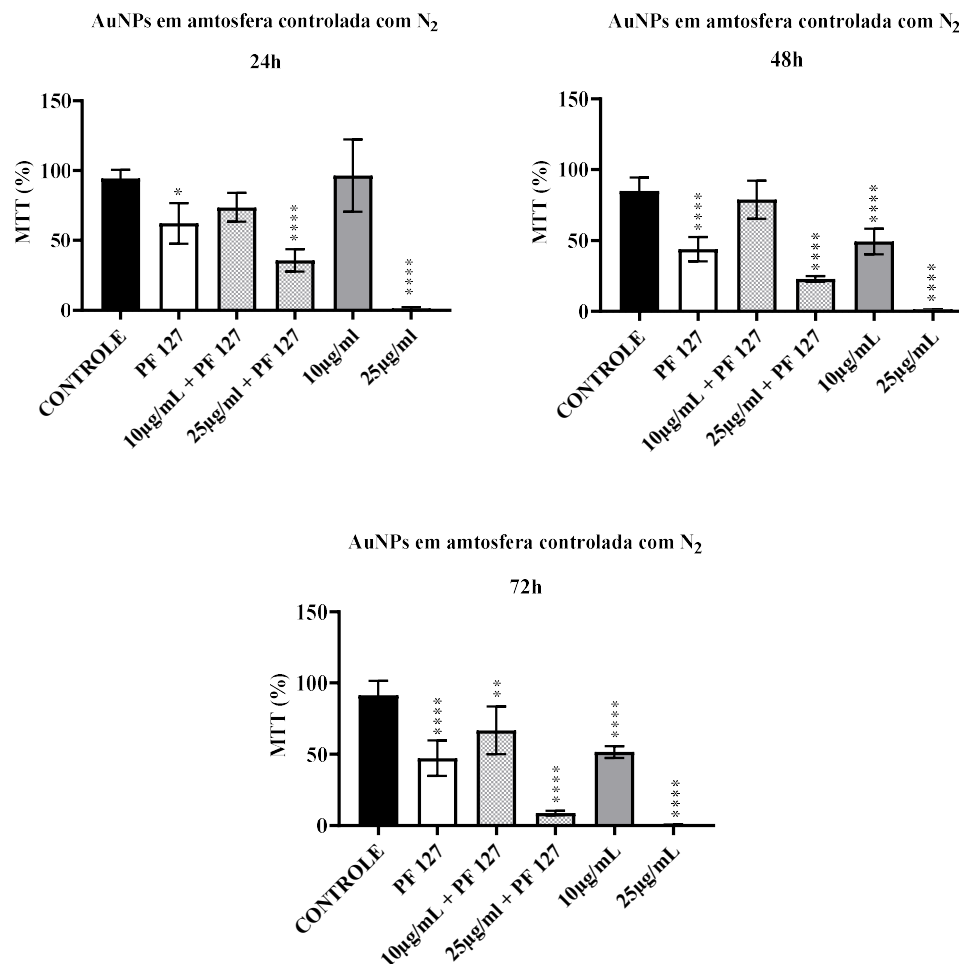


Figura 4.23: Os resultados dos ensaios de viabilidade celular foram descritos pela média normalizada dos dados brutos da leitura das absorvâncias a 570nm em relação ao controle, expresso em porcentagem $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$.

A Tabela 4.7 com as médias normalizadas da absorvância em relação ao controle, expressas em porcentagem e o desvio padrão dos tratamentos nos respectivos tempos 24h, 48h e 72h.

Tabela 4.7: Médias normalizadas da absorvância obtidas no ensaio de viabilidade celular

Tratamentos	Concentração	24h	48h	72h
Controle PF127	1 mg/mL	58,3±14,6	40,8±9,8	42,8±14,0
AuNPs 2mM de NaOH + PF127	10µg/mL	93,7±17,5	88,9±29,6	199,7±50,1
	25µg/mL	76,2±10,6	95,9±21,3	90,8±20,0
	50µg/mL	62,7±10,0	38,8±28,4	16,9±4,1
AuNPs 2mM de NaOH	10µg/mL	64,6±25,1	90,3±24,3	81,9±29,1
	25µg/mL	54,9±16,2	56,6±11,7	59,9±12,4
	50µg/mL	44,0±11,0	22,7±9,1	14,4±5,0
AuNPs 4mM de NaOH + PF127	10µg/mL	101,6±17,2	76,9±22,1	81,4±25,3
	25µg/mL	54,8±9,4	56,7±13,0	38,9±5,6
	50µg/mL	5,4±2,5	15,4±3,9	2,5±1,8
AuNPs 4mM de NaOH	10µg/mL	30,7±16,6	27,4±25,3	74,4±14,6
	25µg/mL	23,4±10,5	40,8±13,3	33,2±11,9
	50µg/mL	4,2±2,3	0,5±7,3	3,9±2,9
AuNPs 2mM de NaOH + PF127 em atm controlada com N ₂	10µg/mL	70,0±11,6	75,3±13,5	62,1±17,1
	25µg/mL	33,4±8,3	22,9±1,8	8,0±2,1
AuNPs 2mM de NaOH em atm controlada com N ₂	10µg/mL	81,5±27,8	49,4±8,3	51,6±3,9
	25µg/mL	0,8±0,9	0,9±0,6	0,2±0,6
AuNPs por síntese química + PF127	10µg/mL	69,3±11,7	77,5±14,6	83,5±14,25
	25µg/mL	3,7±5	-2,7±0,3	2,5±1,85
AuNPs por síntese química	10µg/mL	92,0±7,1	47,1±6,3	50,1±5,88
	25µg/mL	6,4±8,6	0,1±3,0	3,4±0,73

De modo geral, as nanopartículas de ouro obtidas via ablação a laser em atmosfera ambiente com 2mM de NaOH e com 4mM de NaOH na presença e ausência do Pluronic® F127 nas concentrações 10µg/mL e 25µg/mL foram as que menos afetaram a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7, sendo, portanto, menos citotóxicas. No caso das AuNPs via ablação a laser em atmosfera controlada com N₂ a concentração 10µg/mL na presença e ausência do Pluronic® F127 foi a que apresentou menor potencial citotóxico, assim como no caso dos tratamentos com as AuNPs via síntese química. Diante desses resultados, foram escolhidas as concentrações 10µg/mL e 25µg/mL de todos os tratamentos para os ensaios de proliferação, EROs e ERNs.

4.2.3 Proliferação

Para avaliar se os tratamentos com as nanopartículas de ouro prejudicam o crescimento celular, a linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi cultivada por 72h com concentração de AuNPs igual a 0µg/mL, 10µg/mL e 25µg/mL. As concentrações utilizadas para cada nanopartícula foram escolhidas com base na literatura e a partir do ensaio de citotoxicidade (0µg/mL, 10µg/mL, 25µg/mL e 50µg/mL) e a proliferação foi avaliada por meio de análise celular de alto conteúdo. Os resultados dos ensaios de proliferação celular foram descritos pela média dos dados brutos da quantificação do núcleo celular para estimativa da proliferação celular em porcentagem $\pm$ desvio padrão. A Figura 4.24 demonstra a proliferação celular dos macrófagos tratados com 10µg/mL e 25µg/mL das nanopartículas produzidas via ablação a laser com 2mM de NaOH nos tempos de 24h, 48h e 72h, sendo possível observar que não houve diferença significativa em relação ao controle. O controle PF, isto é, a célula tratada apenas com o Pluronic® F127 apresentou uma ligeira diferença em relação ao controle no tempo de 48h ($81,47\% \pm 0,79$). As células tratadas com 10µg/mL e 25µg/mL das nanopartículas produzidas via ablação a laser com 4mM de NaOH (Figura 4.24) também não apresentaram diferença significativa nos tempos de 24h, 48h e 72h. As nanopartículas produzidas quimicamente (Figura 4.25) também não apresentaram diferenças significativas no tratamento dos macrófagos nos respectivos tempos. As nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser em atmosfera de N₂ não interferiram na proliferação celular dos macrófagos RAW 264.7 (Figura 4.24). De modo geral, as nanopartículas de ouro não inibiram a proliferação das células.

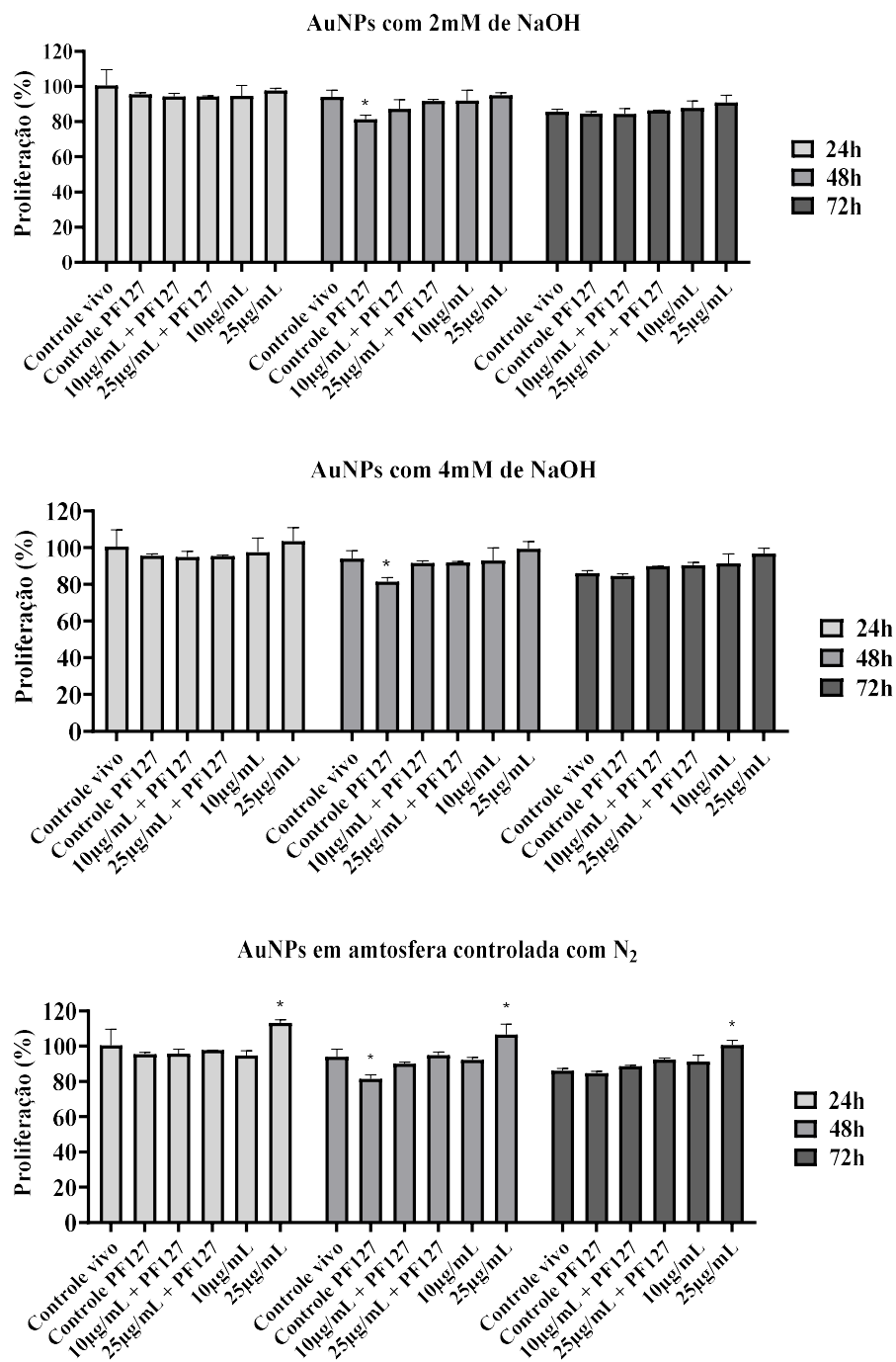


Figura 4.24: Ensaio de proliferação celular dos macrófagos RAW 264.7 tratadas com nanopartículas de ouro via ablação a laser. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste Two-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$.

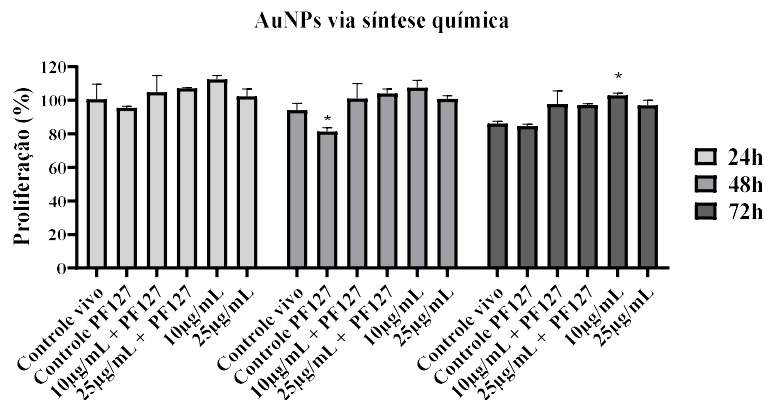


Figura 4.25: Ensaio de proliferação celular dos macrófagos RAW 264.7 tratadas com nanopartículas de ouro via síntese química. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste Two-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$.

4.2.4 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O termo espécies reativa de oxigênio (EROs) refere-se a um grupo de compostos contendo oxigênio que estão envolvidos na sinalização e homeostase celular, e inclui O_2 , H_2O_2 e OH . O estresse oxidativo ocorre quando essas moléculas são produzidas em maior quantidade, e pode levar a danos significativos ao DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para processos inflamatórios [176]. Nesse sentido, foi realizado um estudo para avaliar se as nanopartículas de ouro nas diversas condições induzem alguma alteração na produção de EROs, todavia, é possível notar que de modo geral as células tratadas com as AuNPs tiveram uma certa diminuição da produção de EROs, conforme ilustra as Figuras 4.26 e 4.27.

O ensaio sem a presença de LPS se deu com o objetivo de medir a produção intracelular de EROs a fim de determinar se as AuNPs podem induzir o estresse oxidativo em macrófagos. O ensaio foi realizado conforme apresentado no item 3.16, e após 24h de tratamento as células macrófagos foram marcadas com uma sonda fluorescente, o DHE, que se trata de um indicador de superóxido que quando oxidado é transformado em EthD-1, se intercalando ao DNA e fluorescendo na região espectral do vermelho. Dessa forma, foi possível observar uma produção endógena de EROs e sua respectiva redução mais significativa nos

tratamentos com AuNPs com 2mM de NaOH (10µg/mL e 25µg/mL com Pluronic® F127), AuNPs com 4mM de NaOH (25µg/mL com Pluronic® F127, 10µg/mL e 25µg/mL) e as AuNPs com 2mM de NaOH em N₂ com vácuo (25µg/mL com Pluronic® F127, 10µg/mL e 25µg/mL). No tratamento com a AuNPs sintetizadas por via química a menor taxa de redução das EROs se deu pelo tratamento com 10µg/mL com Pluronic® F127. Esses dados indicaram que o estresse oxidativo não é induzido nessas células em resposta à exposição as AuNPs, fato que é reportado na literatura para as nanopartículas de ouro sintetizadas via química [219].

Outro ensaio foi realizado usando a mesma sonda fluorescente, DHE, porém, agora na presença do LPS (conforme descrito no item 3.16). A presença do LPS implica em um aumento da produção de EROs, então, para verificar se as AuNPs promovem uma redução da produção de EROs sobre um estímulo, todas as células foram tratadas com LPS, com exceção do controle, o qual será usado para fins comparativos com relação ao controle LPS, para mensurar a integridade do ensaio e verificar o aumento da produção de EROs nas células com LPS. O ensaio submetido ao estímulo do LPS mostrou uma redução significativa das EROs em todos os tratamentos em relação ao controle LPS, de modo a evidenciar que quando as células são estimuladas com LPS e tratadas com AuNPs há uma redução da produção de EROs, o que é consistente com outros resultados relatados em macrófagos [29, 176].

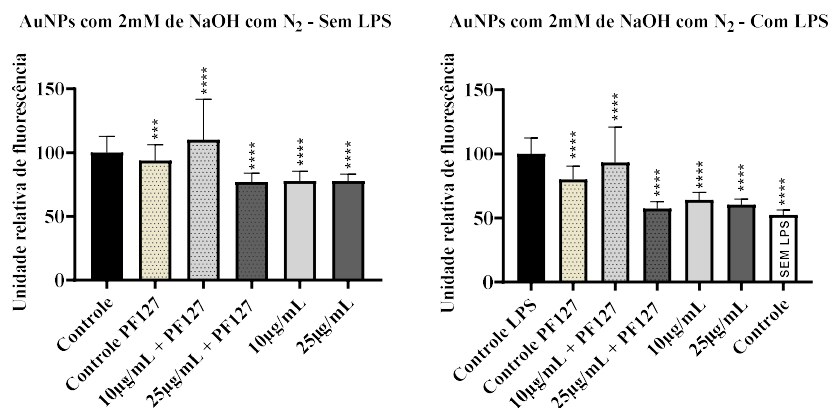


Figura 4.26: Avaliação da presença da EROs em macrófagos RAW 264.7 tratados com AuNPs via ablação a laser em atmosfera controlada. Os resultados dos ensaios de EROs foram descritos pelas unidades relativas de fluorescência $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey,

comparados ao respectivo grupo controle para as análises sem LPS e ao grupo controle LPS para as análises com LPS. O valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$.

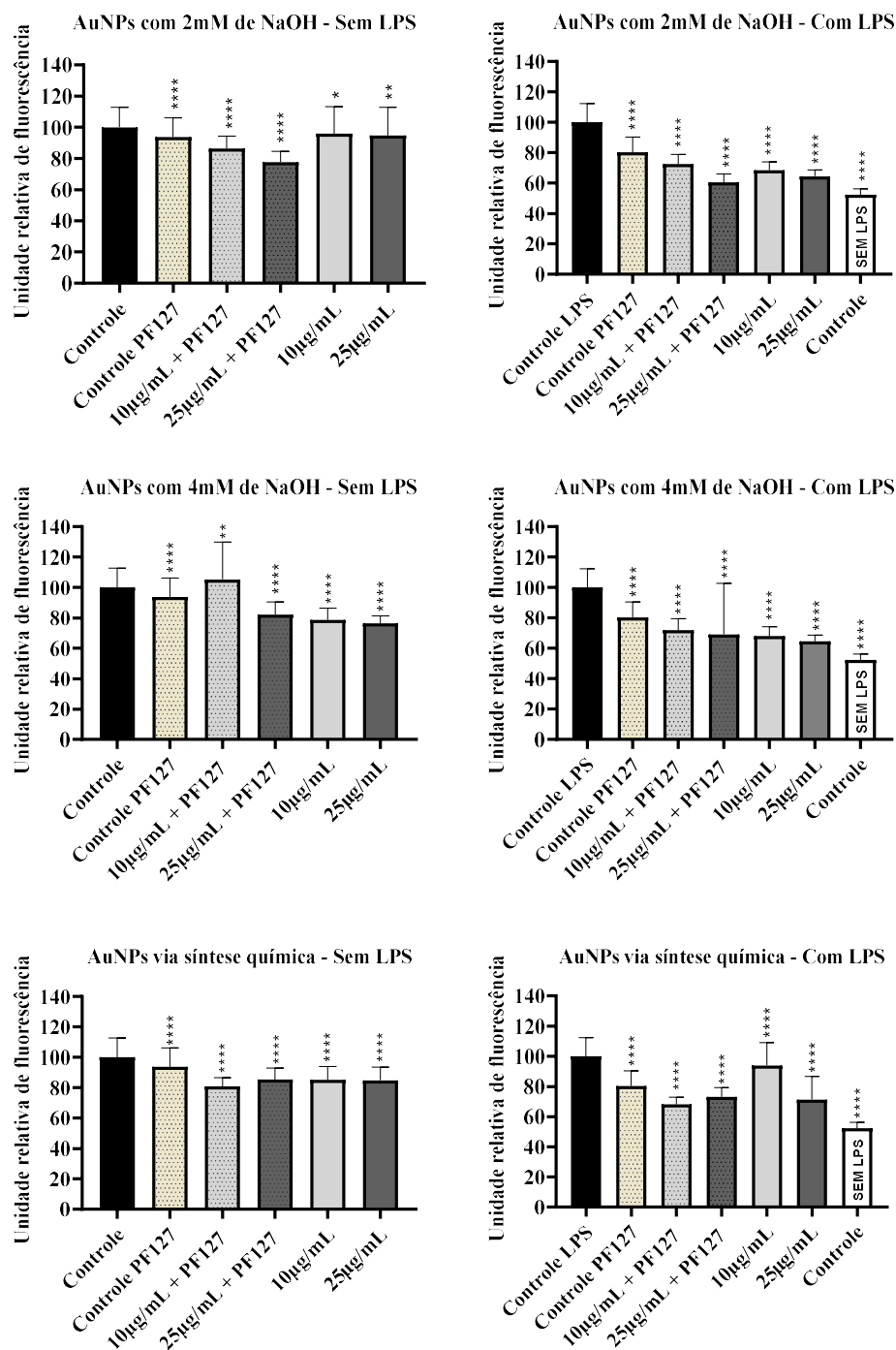


Figura 4.27: Avaliação da presença da EROs em macrófagos RAW 264.7 tratados com AuNPs. Os resultados dos ensaios de EROs foram descritos pelas unidades relativas de fluorescência $\pm$ desvio padrão. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey, comparados ao respectivo grupo controle para as análises sem LPS e ao grupo controle LPS para as análises com LPS. O valor-p definido em: * $<0,01$; ** $<0,001$; *** $<0,0001$.

Na Tabela 4.8, é possível observar a os dados estatísticos das células tratadas com as diversas condições na presença e ausência de LPS. Para o ensaio sem LPS os dados normalizados em relação ao controle (refere-se a célula na ausência das AuNPs e LPS), enquanto no ensaio com LPS os dados foram normalizados em relação ao controle LPS (refere-se a célula na ausência das AuNPs e com LPS) e ambos são expressos em Unidades Relativas de Fluorescência (URF).

Tabela 4.8: Dados estatísticos obtido no ensaio das EROs

Tratamentos	Concentração	Sem LPS	Com LPS
		URF	URF
Controle	-	100±12,7	52,3±19,7
Controle PF 127	1mg/mL	93,8±12,3	80,2±12,3
AuNPs com 2mM de NaOH+PF127	10µg/mL	86,4±7,8	72,5±7,8
AuNPs com 2mM de NaOH+PF127	25µg/mL	77,7±6,9	60,5±6,9
AuNPs com 2mM de NaOH	10µg/mL	95,9±17,2	68,5±17,2
AuNPs com 2mM de NaOH	25µg/mL	94,8±18,1	64,4±18,1
AuNPs com 4mM de NaOH+PF127	10µg/mL	105,2±24,7	71,9±24,7
AuNPs com 4mM de NaOH+PF127	25µg/mL	82,0±8,5	69,2±8,5
AuNPs com 4mM de NaOH	10µg/mL	78,7±7,7	68,1±7,7
AuNPs com 4mM de NaOH	25µg/mL	76,4±4,8	64,5±4,8
AuNPs via síntese química	10µg/mL	80,9±5,5	68,0±5,5
AuNPs via síntese química	25µg/mL	85,4±7,5	73,1±7,5
AuNPs via síntese química + PF127	10µg/mL	85,2±8,6	93,9±8,6
AuNPs via síntese química + PF127	25µg/mL	84,8±8,8	71,4±8,8
AuNPs com 2mM de NaOH+PF127 e N ₂	10µg/mL	109,9±31,9	93,4±31,9
AuNPs com 2mM de NaOH+PF127 e N ₂	25µg/mL	76,9±7,1	57,3±7,1
AuNPs com 2mM de NaOH e N ₂	10µg/mL	77,7±7,6	64,0±7,6
AuNPs com 2mM de NaOH e N ₂	25µg/mL	77,7±5,3	60,3±5,3
Controle LPS	1ng/mL	107,1±19,7	100±12,7

Os resultados dos ensaios de EROs foram descritos por meio da normalização da intensidade média do pixel, ou seja, UFR (unidades relativas de fluorescência), sendo descritos, portanto, pelas unidades relativas de fluorescência ± desvio padrão.

Mediante os resultados obtidos é possível verificar que as AuNPs de modo geral contribuíram para a taxa de redução das EROs. A nossa hipótese para o caso das AuNPs sintetizadas por PLA é que tal fato pode estar interligado ao processo de CO₂RR, contribuindo para que as AuNPs se comportem, de certa forma, como um CORM e libere a CO. Estudos reportam que a CO pode inibir a atividade da NADPH-oxidase suprimindo a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos, apontando para uma possível atividade anti-inflamatória [152].

4.2.5 Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

A fim de avaliar a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) utilizou-se ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess. A partir desse ensaio foi possível medir a concentração de óxido nítrico nas células macrófagos tratados com as AuNPs sintetizadas por PLA em água. No entanto, essa análise foi realizada na Itália em parceria com a Prof.^a Dr.^a Anna Laurenzana do Departamento de Ciências Biomédicas Experimentais e Clínicas da Universidade dos Estudos de Florença (UNIFI). A determinação da concentração de óxido nítrico (NO) se deu para a AuNP sintetizada por PLA em água.

Os níveis de nitrito foram determinados pelo método de Griess, e a medição deste parâmetro é amplamente aceita como indicativa de produção de NO. Seguindo os protocolos descritos no item 3.17, o reagente de Griess foi adicionado a cada poço para iniciar a reação, à temperatura ambiente por 30min. Em seguida, a absorbância foi medida em 540nm em leitor de microplacas (Biotek, Winooski, VT, EUA). A quantidade de nitrito no meio foi calculada a partir da curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) (Figura 4.28).

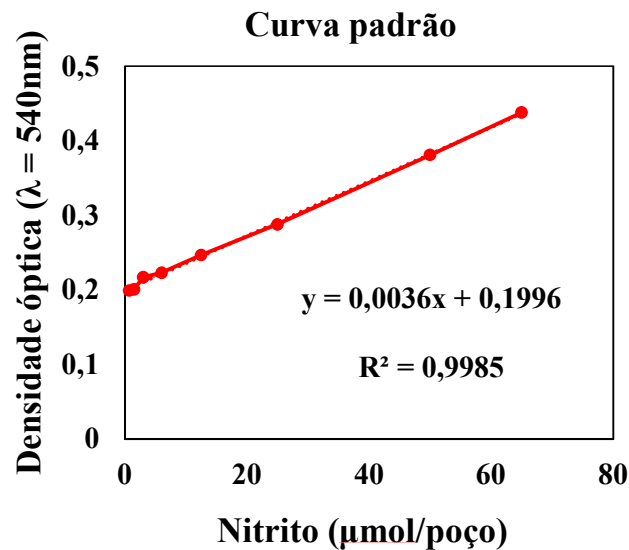


Figura 4.28: Curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) utilizada para a determinação da concentração de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cultura dos macrófagos RAW 264.7.

Na Figura 4.29, é possível observar que nos macrófagos RAW 264.7 estimuladas com LPS há indução da produção de NO enquanto nas células o tratadas com as AuNPs não há indução da produção de NO. Nas células que foram submetidas ao estímulo por LPS e tratadas com as AuNPs foi possível observar uma redução do nível de nitrito.

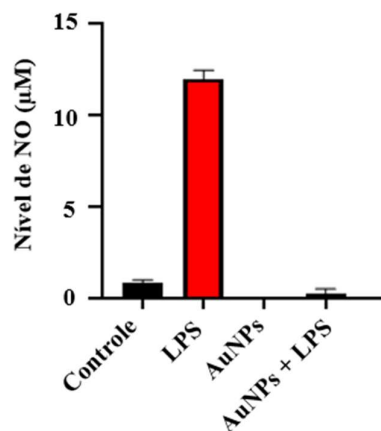


Figura 4.29: Efeito das AuNPs na produção de nitrito nos macrófagos RAW 264.7. Os macrófagos RAW 264.7 foram expostas a $1\mu\text{g/mL}$ de LPS na presença ou ausência de AuNPs. O meio com as células não tratadas foi denominado de controle. O tratamento com LPS produz aumento dos níveis de nitrito, enquanto o tratamento com AuNPs mediante a exposição ao LPS reduz os níveis de nitrito.

Esses resultados mostram um possível efeito imunomodulador das nossas nanopartículas de modo a reduzir a produção de NO.

4.2.6 Avaliação morfológica por meio da microscopia óptica invertida de contraste de fase

Os macrófagos RAW 264.7 apresentam características aderentes durante o cultivo celular. Nas análises morfológicas a seguir analisamos as células RAW 264.7 após sua exposição as AuNPs em todas as condições apresentadas no trabalho com a concentração igual a 10µg/mL, que aparentemente apresentou menor citotoxicidade no ensaio de viabilidade celular, não proporcionou um aumento significativo de EROs intracelular e contribuiu para a redução de EROs quando submetido a presença do LPS. Todas as células submetidas ao tratamento foram sempre comparadas às células saudáveis (condição sem a presença de AuNPs) nos tempos de 24, 48 e 72h. Para cada condição foram analisados 10 campos aleatórios. Após as 24h do tratamento, pode-se observar que todas as células aparentam estar aderidas no fundo do poço e que houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs com 2mM de NaOH na presença e ausência de Pluronic® F127, sintetizadas em atmosfera controlada com N₂ (Figura 4.30). Em 48h após a exposição às AuNPs, houve um aumento na densidade celular, confirmando os resultados referentes a proliferação celular, o qual não constatou um comportamento antiproliferativo. Nesse caso, a alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂ foram mantidas (Figura 4.31). No tempo de 72h após o tratamento as células ainda se encontram aderidas e com maior densidade celular mostrando que não há alteração significativa da proliferação celular (Figura 4.32). Além disso, é possível notar maior adesão célula-célula. Ademais, foi possível observar uma maior alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera com N₂, e nos macrófagos tratados com as AuNPs produzidas por via química e sem Pluronic® F127.

24h de tratamento com as AuNPs

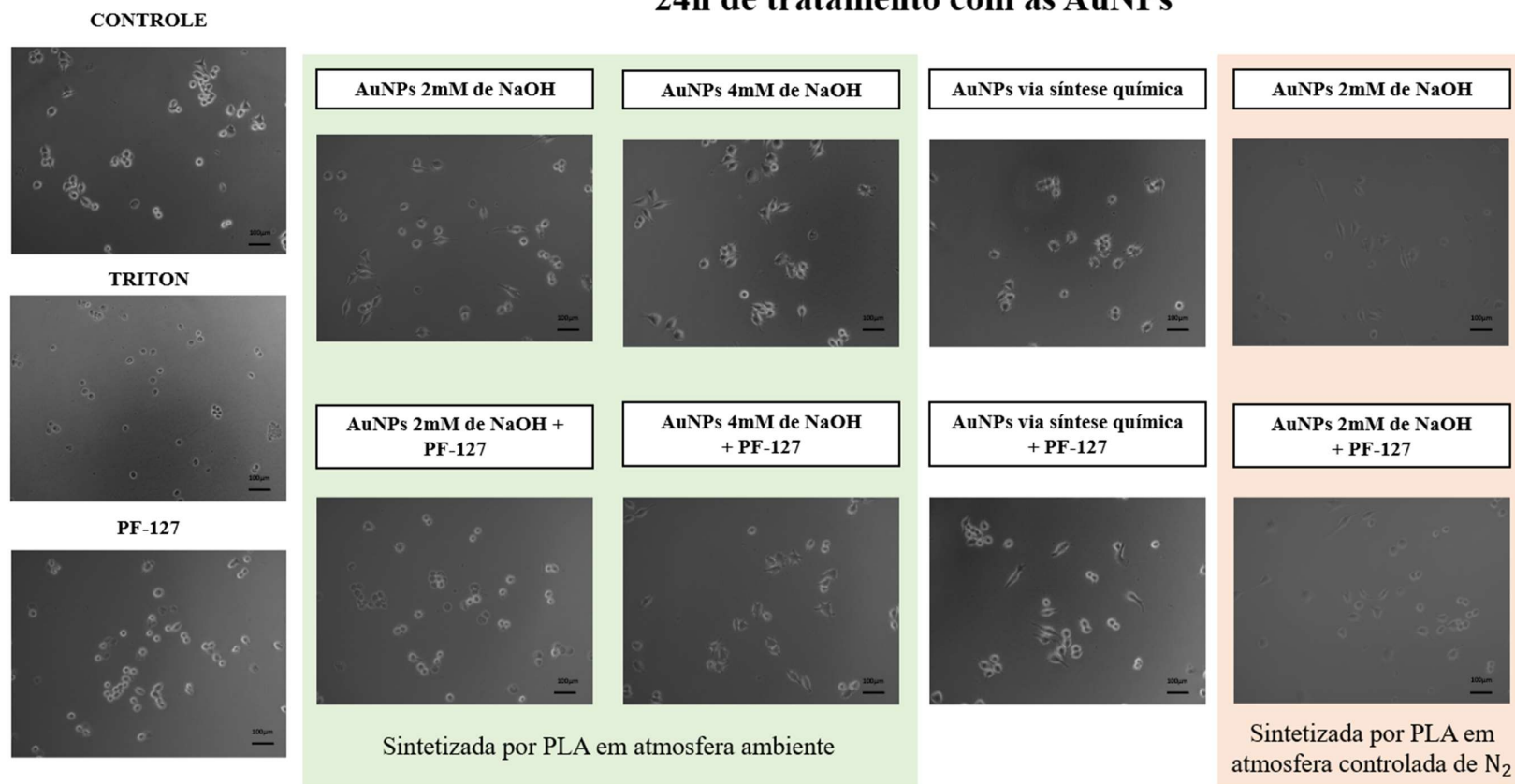


Figura 4.30: Análise morfológica dos macrófagos RAW 264.7 após 24h de exposição a diferentes tratamentos com AuNPs na concentração de 10µg/mL. Houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM-HIGH, Triton representa as células mortas e PF-127 representa as células cultivadas em DMEM-HIGH com Pluronic® F127. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 100µm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição.

48h de tratamento com as AuNPs

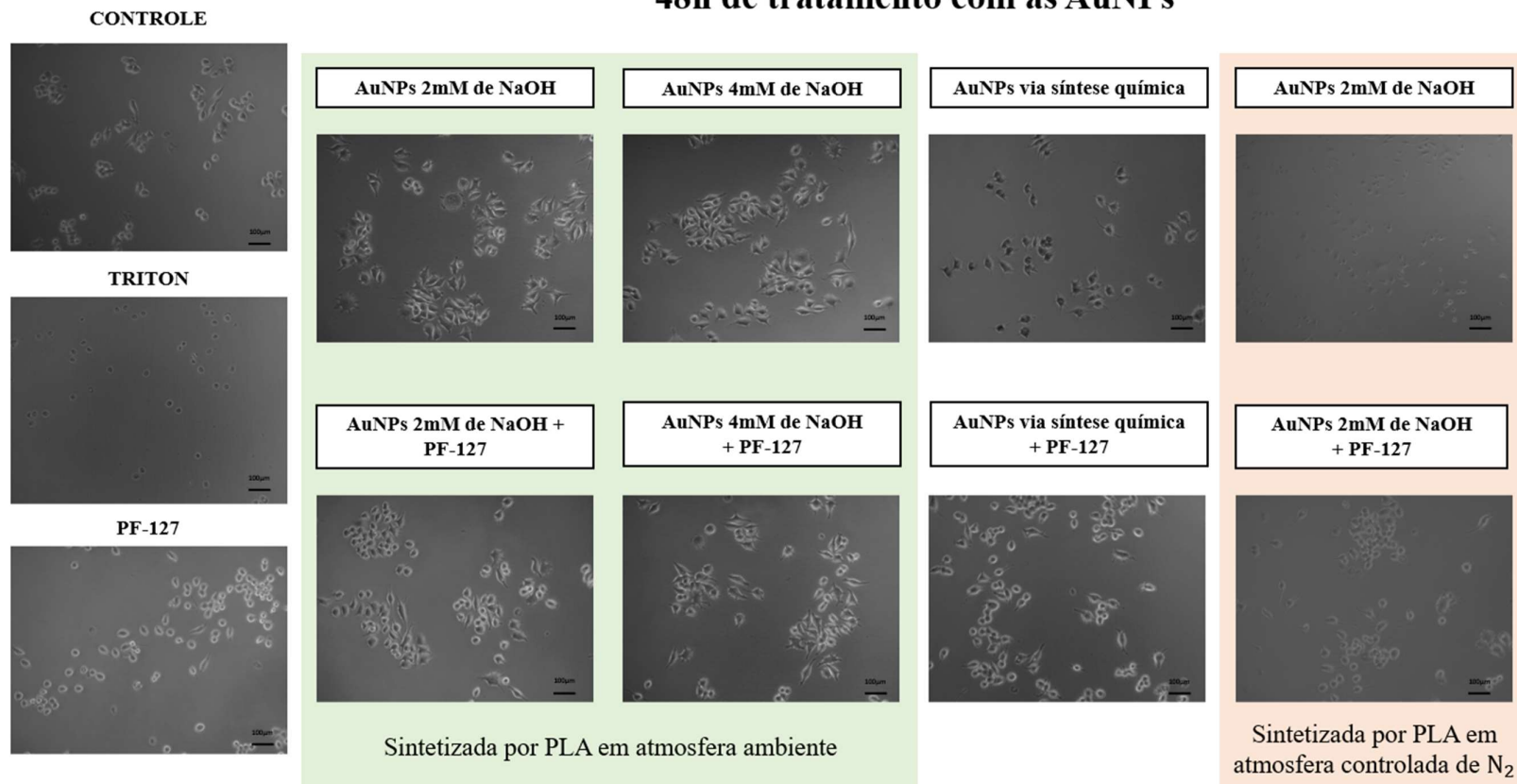


Figura 4.31: Análise morfológica dos macrófagos RAW 264.7 após 48h de exposição a diferentes tratamentos com AuNPs na concentração de 10µg/mL. Houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM-HIGH, Triton representa as células mortas e PF-127 representa as células cultivadas em DMEM-HIGH com Pluronic® F127. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 100µm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição.

72h de tratamento com as AuNPs

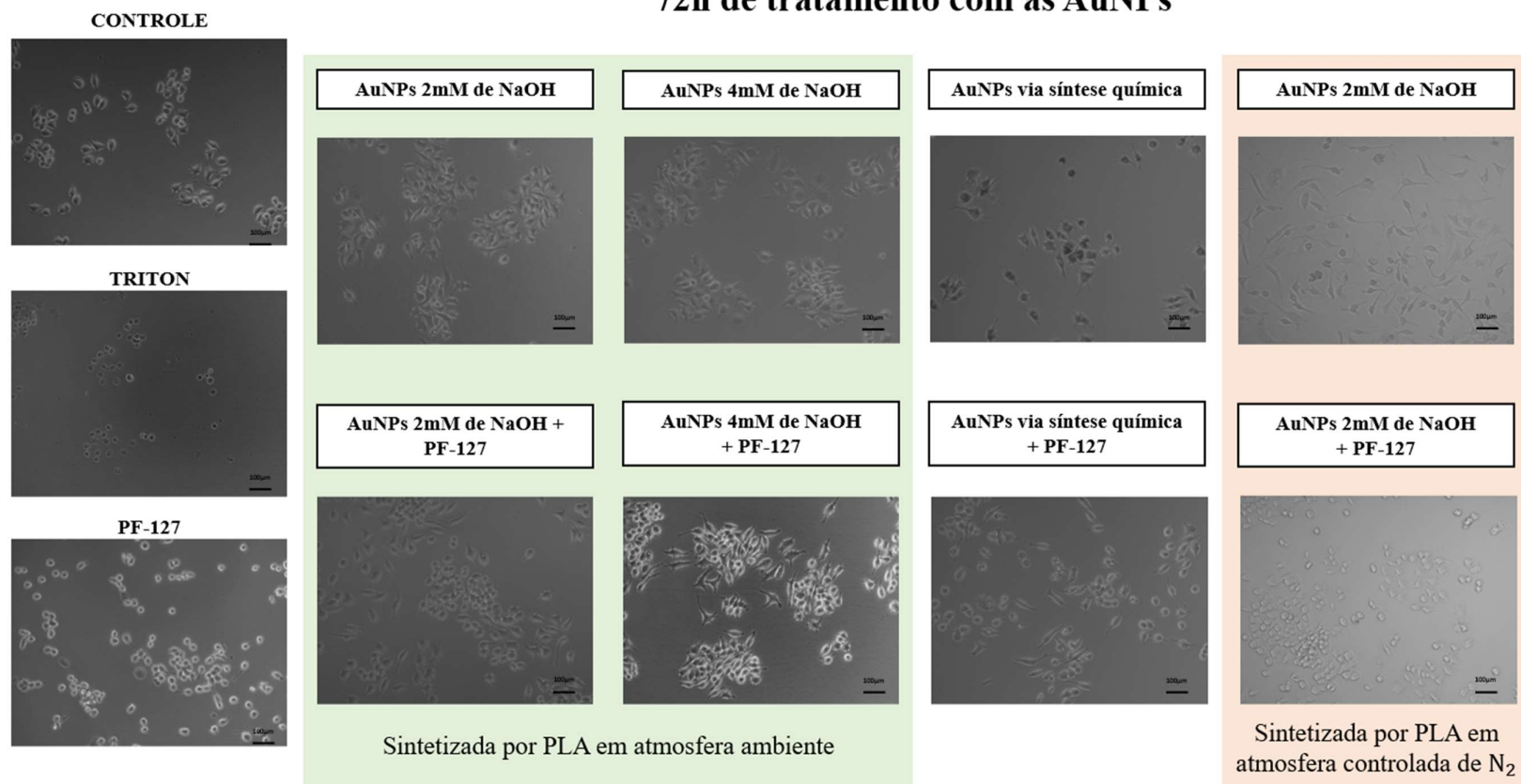


Figura 4.32: Análise morfológica dos macrófagos RAW 264.7 após 72h de exposição a diferentes tratamentos com AuNPs na concentração de 10 μg/mL. Houve alteração morfológica nas células tratadas com AuNPs sintetizadas em atmosfera controlada com N₂ e nos macrófagos tratados com as AuNPs produzidas por via química e sem Pluronic® F127. O controle representa células viáveis, apenas cultivadas em DMEM-HIGH, Triton representa as células mortas e PF-127 representa as células cultivadas em DMEM-HIGH com Pluronic® F127. As imagens foram obtidas por software acoplado ao microscópio óptico invertido de contraste de fase. Escala: 100 μm. Foram analisados 10 campos aleatórios para cada condição.

4.2.7 Avaliação morfológica por meio da microscopia de varredura (MEV)

Com o propósito de visualizar as estruturas da célula RAW 264.7 e avaliar a morfologia utilizou-se a microscopia de varredura (MEV). Para tal análise foi escolhido o tratamento com 10µg/mL de AuNPs com 2mM de NaOH na presença e na ausência do Pluronic® F127, visto que essa condição foi a que apresentou menor taxa de citotoxicidade na análise de viabilidade por MTT. Diante das imagens podemos perceber que a célula controle, isto é, aquela que não recebeu nenhum tipo de tratamento, aparentemente, apresentaram células espariadas com membranas bem definidas e estrutura microfibrilar do citoesqueleto visível sob a projeção da membrana plasmática (Figura 4.33 (A)). Enquanto as células tratadas com as AuNPs aparentam uma predominância de morfologia arredondada, indicando uma possível alteração do citoesqueleto dos macrófagos RAW 264.7 (Figura 4.33 (B) e (C)). Na imagem de maior aumento podemos observar os filopódios, isto é, as projeções celulares no entorno da célula. Os filopódios desempenham um papel importante na migração e na comunicação entre as células. Comparando as células tratadas com o controle podemos observar que aparentemente não há uma alteração significativa das projeções celulares ao entorno da célula RAW 264.7 (Figura 4.33 (D) – (F)).

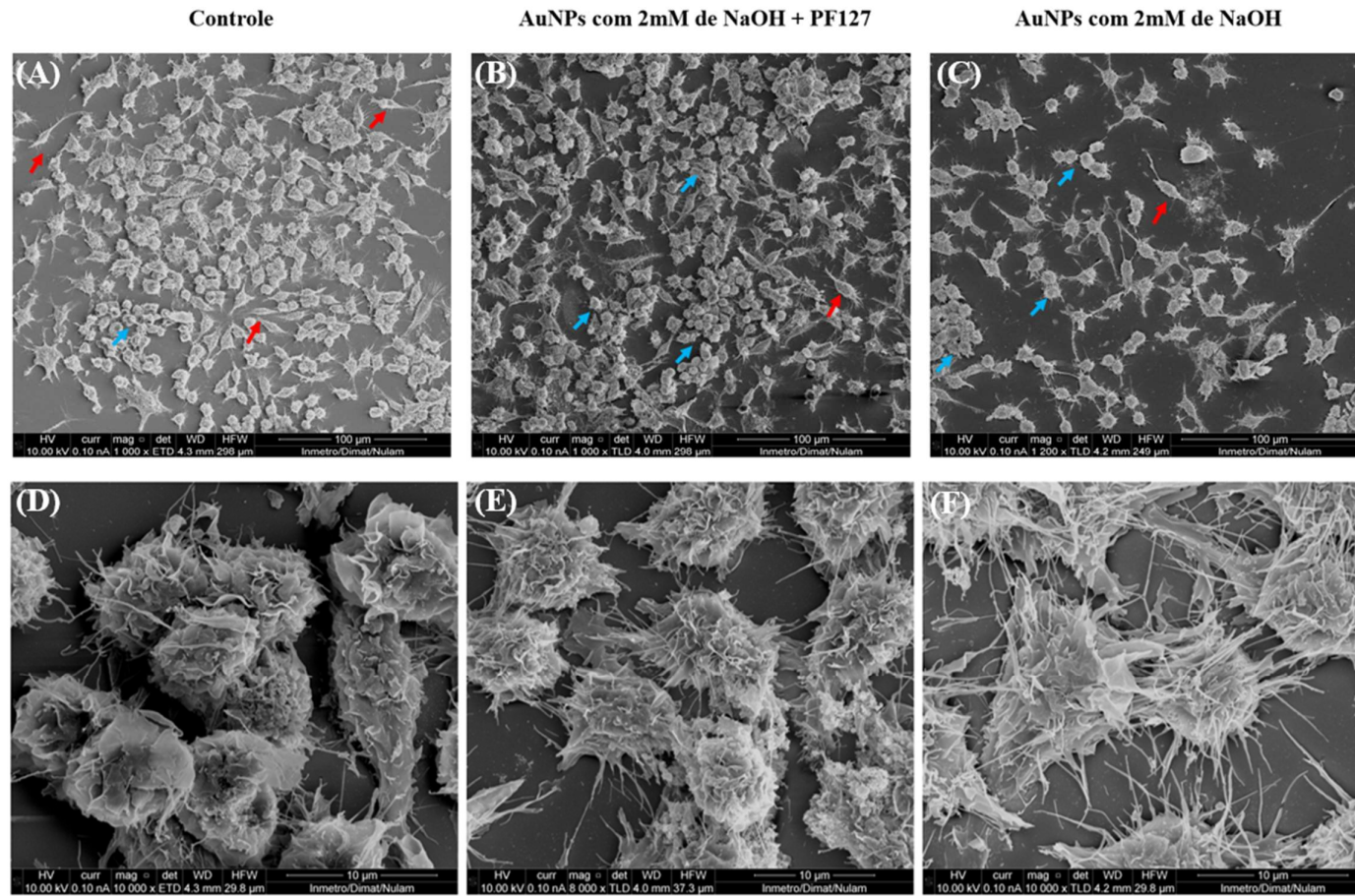


Figura 4.33: Imagens de microscopia de varredura (MEV) da célula RAW 264.7 de amostras controle (A e D) e tratadas com AuNPs com 2mM de NaOH e PF127 (B e E) e com AuNPs com 2mM de NaOH (C e F). As setas em vermelho indicam a morfologia mais alongada e a seta em azul indica a morfologia mais arredondada.

4.2.8 Conclusão segundo a aplicação biológica das AuNPs

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O princípio deste ensaio consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan, em que é acumulado dentro da célula e pode ser quantificado por uma análise espectrofotométrica. Sendo assim, os macrófagos RAW 264.7 tratadas com as distintas condições de AuNPs utilizadas no presente trabalho foram submetidas ao ensaio de viabilidade o qual evidenciou que as AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH sintetizadas por PLA em água produzidas em ar ambiente, e na presença ou ausência do Pluronic® F127 nas concentrações 10µg/mL e 25µg/mL foram menos citotóxicas. Os tratamentos com 25µg/mL com e sem Pluronic® F127 apresentaram caráter citotóxico tanto para o tratamento com AuNPs via síntese química quanto para as AuNPs via ablação a laser em atmosfera controlada com N₂.

O ensaio de proliferação celular foi realizado com o objetivo de avaliar se os tratamentos com as nanopartículas de ouro prejudicam o crescimento celular, a linhagem de macrófagos RAW 264.7, e, para tanto, utilizou-se a concentração de 10µg/mL e 25µg/mL para todas as condições de AuNPs utilizadas no trabalho. De modo geral verificamos que a proliferação, isto é, o crescimento celular não é prejudicado após o tratamento com as nanopartículas.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas de sinalização que desempenham um papel importante na progressão de distúrbios inflamatórios. As EROs são produzidas por células do sistema imune, como os macrófagos, podendo levar a disfunção endotelial por oxidação de proteínas de sinalização celular. Portanto, foi investigado se as nanopartículas de ouro nas diversas condições induzem alguma alteração na produção de EROs. Todavia os resultados apontam que não houve indução de EROs mediante à exposição as AuNPs. O ensaio também foi realizado na presença do LPS para verificar se as AuNPs promovem uma redução da produção de EROs, uma vez que o LPS propicia um aumento da produção de EROs. Os resultados apontam para uma redução significativa das EROs para as células estimuladas com LPS e tratadas com as diversas condições de AuNPs utilizadas no trabalho. Em nossa hipótese, esse fato

pode estar associado ao processo de CO₂RR, contribuindo para que a AuNPs se comporte, de certa forma, como um CORM e libere a CO.

As Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são geradas na cadeia respiratória mitocondrial e por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase e a sua isoforma induzível (*inducible NO synthase*, iNOS) é potencialmente induzida mediante a estímulos pró-inflamatórios. Como os macrófagos são ativados por produtos microbianos usamos os lipopolissacarídeos (LPS) com a finalidade de promover a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevar os níveis de NO. Esse ensaio foi feito pelo método de Griess e realizado em parceria com a Prof.^a Dr.^a Anna Laurenzana do Departamento de Ciências Biomédicas Experimentais e Clínicas da Universidade dos Estudos de Florença (UNIFI). Os resultados referentes as ERNs mostram que nos macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS há indução da produção de NO enquanto nas células não tratadas com as AuNPs não há indução da produção do NO, porém nas células que foram submetidas ao estímulo por LPS e tratadas com as AuNPs foi possível observar uma redução do nível de nitrito. Esse resultado é bastante interessante e aponta para um possível potencial modulador das AuNPs em relação as repostas dos macrófagos ativados por LPS.

A microscopia óptica invertida de contraste de fase e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas para análises morfológicas das células RAW 264.7 após sua exposição as AuNPs. Na microscopia óptica invertida de contraste de fase as células RAW 264.7 foram avaliadas após sua exposição as AuNPs em todas as condições apresentadas no trabalho com a concentração igual a 10µg/mL nos tempos de 24h, 48h e 72h. De modo geral, a concentração 10µg/mL, aparentemente, apresentou menor citotoxicidade, não induziu EROs intracelular e contribuiu para a redução de EROs quando submetido a presença do LPS, sendo, portanto, uma concentração interessante e que merece atenção para estudos futuros. Os macrófagos RAW 264.7 apresentam perfil aderente durante o cultivo celular, e este foi mantido mesmo depois do tratamento com as AuNPs e para todos os tempos analisados. Além do mais, é possível observar que a densidade celular aumenta com o passar do tempo indicando que não há interferência significativa na proliferação celular para as células tratadas com AuNPs. As células tratadas apenas com o Pluronic® F127 não apresentaram alteração aparente em relação ao controle. A microscopia de varredura foi

realizada sobre o tratamento com 10µg/mL de AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas por PLA em atmosfera ambiente estando na presença e na ausência do Pluronic® F127, visto que essa condição, aparentemente, não apresentou citotoxicidade, não induziu EROs intracelular e contribuiu para a redução de EROs quando submetido a presença do LPS. Os macrófagos submetidos ao tratamento com as AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas por PLA na ausência de Pluronic® F127 aparentaram ter uma densidade celular reduzida em relação ao tratamento na presença de Pluronic® F127, fato que também foi observado na microscopia óptica. Além disso, observou-se que os macrófagos tratados com as AuNPs, ao que parece, apresentaram morfologia mais arredondada em comparação ao controle.

5

Conclusões e Perspectivas

Conforme elucidado na Seção de Introdução, o objetivo principal associado a esta dissertação foi a investigação sobre o processo de redução da CO (CO₂RR) durante a PLA de AuNPs em água, o possível efeito modulador das respostas inflamatórias das AuNPs em macrófagos do tipo RAW 264.7 e, por fim, a possível ligação entre o efeito imunomodulador e os produtos secundários obtidos através da CO₂RR.

Assim, dividiremos as conclusões em dois tópicos:

- Produtos provenientes do processo de CO₂RR induzido por PLA do alvo de metal de transição em água;
- Efeito imunomodulador das AuNPs e dos produtos secundários obtidos através da CO₂RR.

Após relatar as conclusões sobre cada tópico citado acima, apresentaremos as perspectivas para o presente trabalho.

5.1 Produtos provenientes do processo de CO₂RR induzido por PLA do alvo de metal de transição em água

Diferentemente do que é reportado de forma recorrente na literatura sobre a PLA em água, resultados obtidos no *NanoLaserLab* do Departamento de Física da PUC-Rio indicam a criação de diferentes espécies orgânicas durante a PLA do alvo de ouro em água, e em nossa hipótese esse fato está associado ao processo de redução da CO₂ (CO₂RR). Os produtos da reação foram identificados por meio da espectroscopia SERS, Raman e DRX.

A espectroscopia SERS realizada sobre a AuNP revelou a presença de nanoestruturas de carbono (banda D e G). Ademais, observações experimentais sustentam a atividade catalítica das AuNPs por meio da detecção, por SERS, do monóxido de carbono (CO) adsorvido no nanomaterial derivado de Au, identificado pela banda 2124cm⁻¹, sendo essa banda também relacionada a cadeias

lineares de carbono, podendo ser indício da presença do composto denominado ouro-carbonil. Na espectroscopia Raman também foi encontrada a presença da banda D e G como produto da redução do CO₂ (CO₂RR). Através da investigação por meio do DRX, também, foi possível identificar a presença de acetato de sódio e de trona como produto da reação CO₂RR.

Dessa forma, podemos verificar que os resultados estão em consonância, corroborando para sustentar a nossa hipótese de formação diferentes compostos mediante ao processo de CO₂RR durante a PLA em água. Os resultados obtidos mostram um perfil interessantes das nanopartículas de ouro que produzimos para possíveis aplicações biológicas.

5.2 Efeito imunomodulador das AuNPs e dos produtos secundários obtidos através da CO₂RR.

Na literatura encontramos estudos sobre efeitos imunomoduladores com ação anti-inflamatória das AuNPs sintetizadas por via química, entretanto, o estudo de AuNPs sintetizadas por PLA em água ainda é incipiente na literatura. Em nosso estudo, procuramos investigar a atuação das nossas nanopartículas no que tange a citotoxicidade, proliferação, EROs, ERNs e alterações morfológicas diante do tratamento em macrófagos RAW 264.7. Os macrófagos são uma das principais células imunoefetoras que desempenham papéis essenciais no sistema imunológico e, segundo estudos mais recentes, estão associadas ao estágio mais grave da COVID-19, por isso foram escolhidas para a presente pesquisa.

Em um panorama geral as AuNPs com 2mM de NaOH sintetizadas em ar ambiente, tanto na presença quanto na ausência do Pluronic® F127 na concentração de 10µg/mL foram as mais interessantes em nossa pesquisa, uma vez que não apresentaram um perfil citotóxico, não interferindo, portanto, na proliferação celular, além de reduzir significativamente as EROs quando as células foram expostas ao LPS. Em nossa hipótese esse fato pode estar associado a conjugação das nossas nanopartículas ao CO, de modo a se comportar como um CORM. A supressão de EROs se dá pela inibição da atividade da NADPH-oxidase pelo CO, segundo estudos reportados na literatura [152], atuando como um agente anti-inflamatório.

O controle das EROs é um ponto crucial para tratamentos de diversas doenças, tal como a COVID-19. Nos estudos mais recentes, mostram que o estágio grave da doença está justamente associado a tempestade de citocinas, a qual está correlacionada a uma resposta inflamatória conduzida primordialmente pelos macrófagos. Sendo assim, a ativação exacerbada dos macrófagos desencadeia uma cascata de eventos como o aumento dos níveis de EROs e ERNs. Nessa perspectiva, o uso de tratamentos que regulem a produção de EROs e ERNs, de modo a modular a resposta dos macrófagos parece ser uma alternativa interessante para o tratamento, e, nesse âmbito, as nossas AuNPs, aparentemente, apresentam características promissoras, uma vez que o uso das nossas nanopartículas de ouro demonstrou reduzir os níveis de EROs e ERNs, podendo, eventualmente, serem utilizadas para futuras aplicações médicas.

5.3 Perspectivas futuras

Do ponto de vista de caracterização pretendemos realizar a difração de raios X das AuNPs sintetizadas por PLA em água realizadas em atmosfera controlada com N₂ a fim de verificar se há presença das fases de acetato de sódio, carbonato de sódio e bicarbonato. Além disso, pretendemos realizar a MET das AuNPs sintetizadas por PLA em água realizadas em atmosfera controlada com N₂, com o intuito de verificar a dimensão dessas nanopartículas.

Em trabalhos futuros pretendemos avaliar a produção de óxido nítrico em todas as condições de AuNPs utilizadas no presente trabalho. Ademais, aspiramos investigar as citocinas envolvidas na inflamação e a correlação das nossas nanopartículas sobre elas, uma vez que estudos prévios demonstram a capacidade das AuNPs de reduzir a produção de mediadores responsáveis pela manutenção da inflamação.

Planejamos realizar a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de amostras biológicas de cultura celular dos macrófagos RAW 264.7 tratados com dispersões coloidais de AuNPs produzidas por PLA em água a fim de verificar se as nanopartículas se encontram no meio intra ou extracelular.

A

Material suplementar

A.1 Difração de raios X (DRX)

A Figura A.1(A) ilustra as componentes principais de um difratômetro. O feixe de raios x gerados são colimados e direcionados para a amostra localizada no porta-amostra [199]. À medida que a amostra e o detector são girados, a intensidade dos raios X refletidos é registrada [199]. Ao atingir o material, os raios X podem ser espalhados de forma elástica, ou seja, não há perda de energia durante a interação com os elétrons dos átomos [199]. Nesse espalhamento, a onda terá direção definida, mesma fase e mesma energia em relação a onda incidente [199]. A geometria de um difratômetro de raios X é tal que a amostra gira no caminho do feixe de raios X colimado em um ângulo θ enquanto o detector de raios X é montado em um braço para coletar os raios X difratados e gira em um ângulo de 2θ [220]. A Figura A.1(B) mostra a configuração de um goniômetro, instrumento usado para manter o ângulo e girar a amostra.

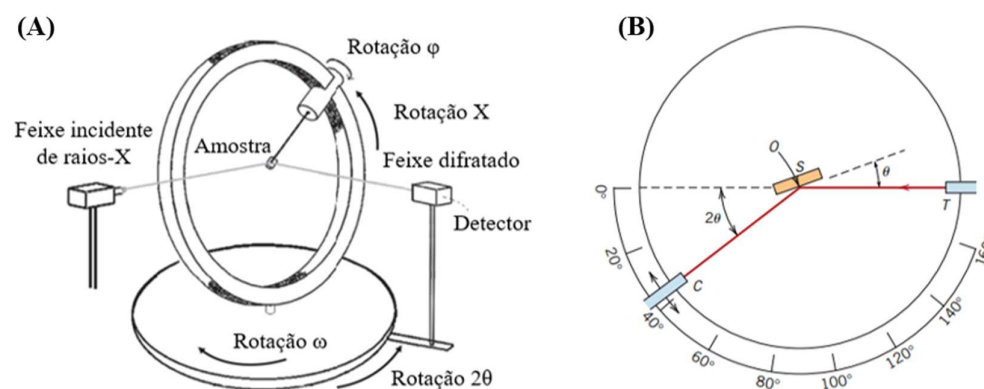


Figura A.1: (A) Diagrama esquemático de um difratômetro de raios X, no qual é constituído por uma fonte fixa de raios x, um detector e o porta amostra. Adaptado de [221]. (B) A amostra é colocada no ponto S (porta-amostra) e as rotações em torno do eixo O são possíveis. O feixe de raios X é gerado no ponto T, e as intensidades dos feixes difratados são detectadas por um detector indicado pela letra C. A amostra, a fonte de raios X e o detector são coplanares. O detector é montado em um carro móvel que também pode ser girado em torno do eixo O. O carro e o porta amostra são acoplados mecanicamente de tal forma que uma rotação da amostra em θ é acompanhada por uma rotação de 2θ do detector, garantindo que os ângulos de incidência e de reflexão sejam mantidos iguais entre si. À medida que o detector se move em velocidade angular constante, registra automaticamente a intensidade do feixe difratado em função de 2θ , isto é, do ângulo de difração. Adaptado de [222].

A Figura A.2, mostra as linhas tracejadas horizontais nas quais representam os planos cristalinos e as retas contínuas que representam os raios X incidentes num cristal. No momento em que a geometria dos raios x que incidem sobre a amostra satisfazem a lei de Bragg, ocorre a interferência construtiva e surge um pico de intensidade, isto é, considerando-se um cristal formado por planos paralelos de íons por uma distância d , podem existir duas condições para um pico e intensidade: os raios X devem ser refletidos de forma especular pelos átomos ou íons, em qualquer um dos planos, e os raios refletidos a partir de sucessivos planos devem interferir construtivamente [199-222].

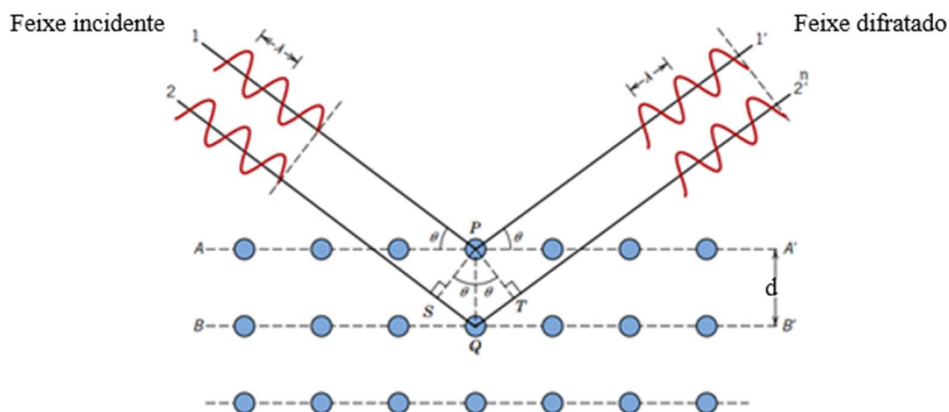


Figura A.2: Condição geométrica para difração de raio X por planos cristalinos. Supondo que dois planos paralelos A-A' e B-B' são separados pelo espaçamento interplanar d . O feixe paralelo, monocromático e coerente de raios x de comprimento de onda λ incide nesses dois planos em um ângulo θ . Os raios denominados de 1 e 2, são espalhados pelos átomos P e Q. A interferência construtiva dos raios espalhados 1 e 2 ocorre também em um ângulo θ em relação aos planos se a diferença de comprimento de caminho entre 1-P-1' e 2-Q-2' (ou seja, $\overline{SQ} + \overline{QT}$) é igual a um número inteiro, n , de comprimentos de onda λ . Adaptado de [222].

A lei de Bragg diz que, a diferença de deslocamento entre dois raios deve ser um número inteiro de comprimentos de onda, portanto, de acordo com a Figura A.2, temos:

$$n\lambda = \overline{SQ} + \overline{QT} \rightarrow n\lambda = d \sin \theta + d \sin \theta \quad [A-1]$$

logo,

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad [A-2]$$

onde n é conhecido como a ordem da difração e compreende um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios X, d é o espaçamento interplanar que gera a difração e θ é o ângulo de difração. Esta lei relaciona o comprimento de onda dos raios X com o ângulo de difração e o espaçamento interatômico da rede em uma amostra cristalina [220]. Caso a lei de Bragg não seja satisfeita, então, a interferência não será construtiva, e o feixe difratado terá intensidade muito pequena [222]. Os raios X difratados são registrados pelo detector, no qual processa esse sinal e converte em uma taxa de contagem, por conseguinte, é transmitido a uma interface computacional, a fim de ser analisado por um software. A conversão dos picos de difração em espaçamentos d , permite a identificação do composto [220, 222].

A estratégia da análise se deu seguindo os seguintes parâmetros: difratômetro operando com voltagem a 50kV, corrente a 0,8mA e a temperatura ambiente, radiação $\text{CuK}\alpha$ cujo comprimento de onda é dado por 1,5416Å, distância do detector igual a 61mm, análise por resolução igual a 0,90Å, rotação phi-scan com detecção em todas as posições 2θ e com passos iguais a 0,0263°.

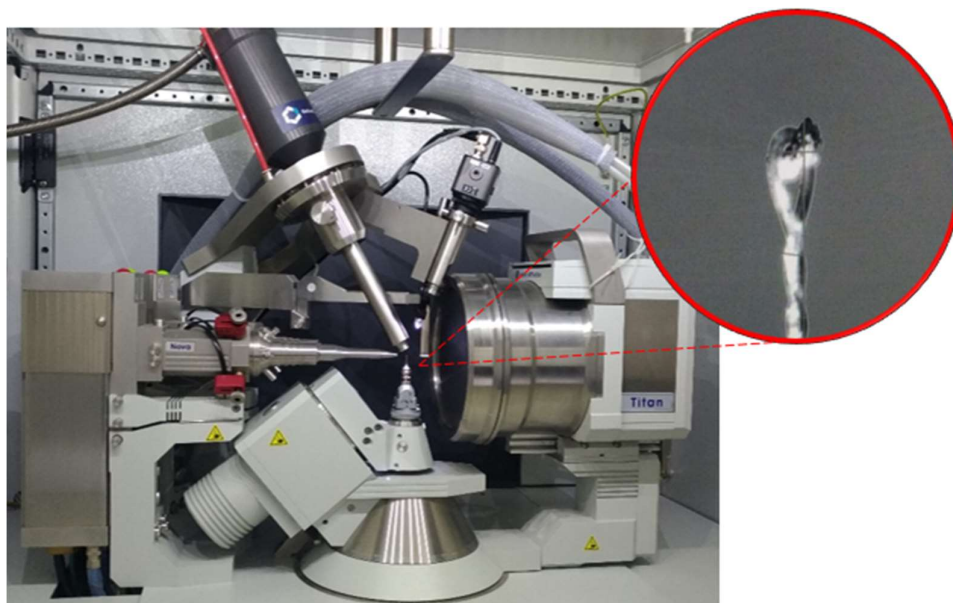


Figura A.3: Análise de difratometria de raio X para monocristais. Amplificação do pó da dispersão coloidal de nanopartícula de ouro depositada na haste do difratômetro (porta amostra).

A.1.1 Preparo da amostra dialisada

Para realizar a diálise utilizou-se membranas de diálise (*Spectra/Por*®3) com 3.5kD, em que, primeiramente, passaram por um processo de limpeza a fim de retirar resíduos de carbono proveniente da glicerina. Para tanto, as membranas foram preenchidas e colocadas em um béquer com água destilada por 7 dias, sendo agitada com o auxílio de uma barra de agitação magnética e um agitador magnético. A água destilada foi trocada diariamente. Após os sete dias, as membranas foram preenchidas e imersas por mais 3 dias em água ultrapura, também sob agitação. Nesse processo, a água ultrapura foi trocada diariamente. Depois do processo de limpeza a dispersão coloidal de AuNPs com 8mM de NaOH foi colocada no interior da membrana e aguardou-se por cerca de 5 dias e durante esse período foi realizada a troca diária da água destilada, a qual a membrana ficou imersa. Posteriormente, a amostra estava pronta para a análise.

A.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) ou espectroscopia de correlação de fótons (PCS, do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*) é uma técnica de medição óptica para a caracterização de sistemas dispersos. O espalhamento dinâmico de luz é utilizado para estimar o diâmetro/raio hidrodinâmico das partículas [223]. Em geral, o DLS usa luz laser focada na amostra (solução, suspensão, emulsão ou aerossol) contida em uma cubeta [223]. Quando a luz laser ilumina a partícula dentro de um pequeno volume focal de uma amostra, a luz será espalhada em todas as direções. Dessa forma, a luz laser é continuamente gravada e quantificada por um detector de contagem de fótons posicionado em um ângulo θ específico, conforme a Figura A.4 [223].

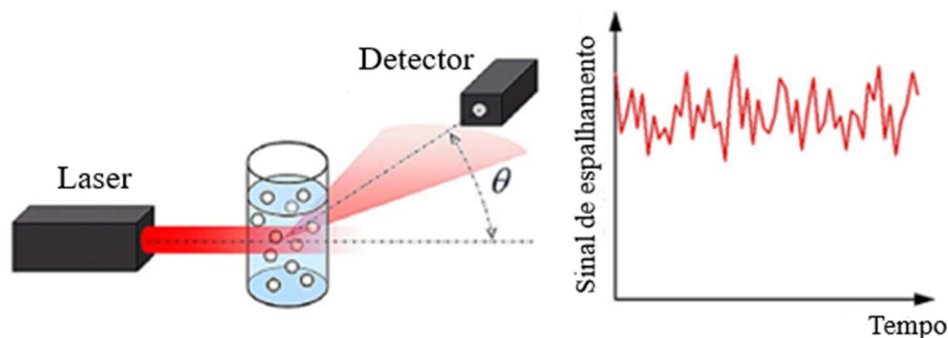


Figura A.4: Esquema de funcionamento da técnica espalhamento dinâmico de luz (DLS), em que a luz espalhada por partículas iluminadas por um laser é medida com alta resolução de tempo sob um ângulo θ definido. A flutuação do sinal de espalhamento reflete a dinâmica dos processos microestruturais, como o movimento browniano das partículas. Adaptado de [224].

As partículas estão em constante movimento devido à colisão aleatória com as moléculas do líquido que as envolve, isto é, as partículas estão em movimento browniano contínuo [225, 226]. O movimento browniano das partículas causa um rearranjo espacial e afeta os sinais de interferência decorrentes do espalhamento da luz, resultando em um sinal flutuante no detector, ou seja, a intensidade da luz espalhada observada no ângulo θ flutua no tempo [225, 226].

O perfil de intensidade total detectada no transcorrer do tempo τ está associado a distribuição de tamanho e do número de partículas contidas na amostra [224, 226]. Sabe-se que, as partículas grandes disponham de mobilidade mais lenta do que as partículas pequenas em se difundir pelo meio viscoso [226]. Assim, o trânsito das partículas pequenas, para dentro e para fora do volume focal (em que ocorre o espalhamento) é mais rápido, logo, o tempo de correlação associado a flutuação do sinal da intensidade da luz espalhada é mais curto, enquanto, que no caso das partículas grandes o tempo de correlação será mais longo, por conta do trânsito lento para dentro e para fora do volume focal de uma amostra [226].

Dessa forma, pode-se determinar o tamanho das partículas esféricas não-interagentes a partir do coeficiente de difusão D , no qual é dado pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad [A-3]$$

em que k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η corresponde a viscosidade do fluido e R_h representa o raio hidrodinâmico de uma partícula esférica. Dessa forma, o DLS fornece o raio hidrodinâmico de uma partícula esférica, ou seja, sua dimensão considerando-se a camada de solvatação que envolve a partícula, e não o raio real da partícula (Figura A.5).

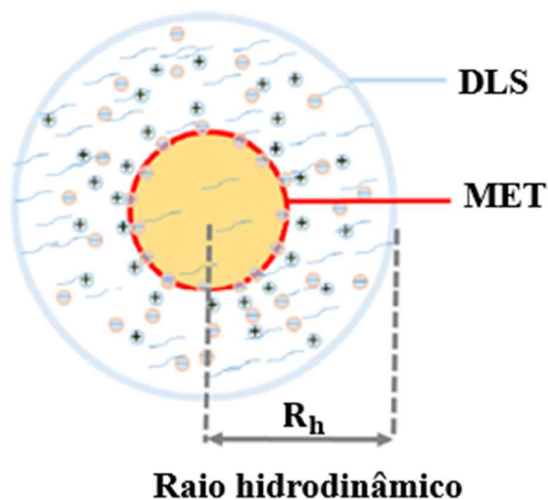


Figura A.5: Representação da relação entre o tamanho hidrodinâmico e o tamanho real do núcleo metálico das NPs. O tamanho hidrodinâmico medido por DLS é sempre maior do que o tamanho dos NPs medidos por TEM [38].

A.2.1 Índice de Polidispersidade (PDI)

As dispersões de nanopartículas são frequentemente polidispersas, ou seja, as dispersões coloidais podem ser compostas por partículas com uma distribuição de tamanhos e formas diferentes [227]. Dessa forma, o índice de polidispersidade (PDI) é uma medida adimensional da heterogeneidade da amostra com base no tamanho [227]. A polidispersidade pode ocorrer devido à distribuição de tamanho ou aglomeração da amostra. O PDI pode ser obtido a partir do espalhamento dinâmico de luz (DLS). As organizações internacionais de padrões (ISOs) estabeleceram que valores de $PDI < 0,05$ são mais comuns para amostras monodispersas, enquanto valores de $PDI > 0,7$ são comuns para uma distribuição de partículas polidispersas (ISO 22.412:2017 e ISO 22.412:2017) [227].

A.2.2 Potencial Zeta

Em uma solução iônica, as nanopartículas com carga líquida terão uma fina camada de íons (de carga oposta) fortemente ligada à sua superfície, a qual é denominada de camada Stern [228, 229]. Quando a partícula se difunde em solução, ela será envolvida por uma camada externa difusa que consiste em íons frouxamente associados, resultando na criação de uma dupla camada elétrica [220, 221]. Essas duas camadas são chamadas coletivamente de dupla camada elétrica. O potencial eletrostático da dupla camada é chamado de potencial Zeta e está relacionado à carga superficial da nanopartícula em solução coloidal [228, 229]. O potencial Zeta é determinado através da medição da velocidade das partículas carregadas movendo-se em direção ao eletrodo através da solução da amostra na presença de um campo elétrico externo [228, 229].

A.2.3 Preparo das amostras para a análise de espalhamento dinâmico de luz e Potencial Zeta

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizada em um DLS *ZetaSizer Nano Series - ZS* (Malvern Instruments, Reino Unido) disponível no Laboratório de Biotecnologia (Labio) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). O aparelho *Zetasizer Nano ZS* é compacto e composto por: laser HeNe de potência 4mW e comprimento de onda igual a 633 nm, atenuador, detector, correlator e um controle de temperatura. O sistema *Zetasizer Nano* mede a taxa de flutuação de intensidade e, em seguida, usa esse artifício para estimar o tamanho das partículas. Este equipamento, dispõe de um software para a aquisição, de modo que várias medidas são feitas e a média dos resultados obtidos é informada.



Figura A.6: Aparelho de espalhamento dinâmico de luz (DLS) *ZetaSizer Nano Series* – ZS localizado no Laboratório de Biotecnologia (Labio) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Para a análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) retirou-se uma alíquota de 1mL das soluções coloidais de AuNPs com 2mM e 4mM de NaOH e na presença de Pluronic® F127, sendo depositadas em uma cubeta. Realizou-se também a análise por espalhamento dinâmico de luz das AuNPs no meio de cultura DMEN-HIGH D5648-1L (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose*, Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™). Assim, adicionou-se 0,5mL da dispersão coloidal de AuNPs na cubeta contendo 0,5mL do meio de cultura. Em ambas as condições foram obtidos o índice de polidispersidade (PDI). O PDI varia de 0 a 1 no software Zetasizer, em que valores maiores do que 1 indicam que a amostra apresenta uma distribuição extremamente polidispersa, revelando que a amostra pode não ser adequada para medição por DLS. A medida do potencial Zeta foi realizada para todas as condições de nanopartículas de ouro sintetizadas por PLA. Utilizou-se uma célula capilar com eletrodo para a medida do potencial Zeta.

A.3 Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)

Um microscópio eletrônico de transmissão típico é composto por três componentes principais: o sistema de iluminação, a lente objetiva/estágio e o sistema de imagem (conforme mostra a Figura A.7). A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite a formação de imagens a partir da interação do feixe de elétrons de alta energia sobre a amostra que é objeto de estudo, transmitindo, assim, sinais nos quais são captados pelo detector [230,

231]. Os elétrons acelerados da fonte de elétrons são focalizados em um feixe uniforme pela lente condensadora, e na sequência atravessam a amostra [230, 231]. Dependendo da espessura da amostra parte desse feixe pode ser difratado [230, 231]. Os feixes transmitidos são focalizados pela lente objetiva formando, portanto, a imagem. Posteriormente, a imagem é ampliada pelas lentes intermediárias e pelo projetor em uma câmera eletrônica [230, 231].

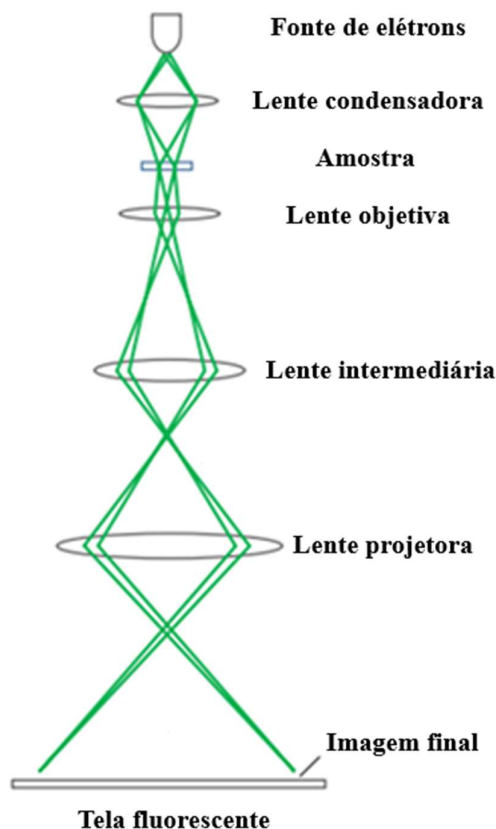


Figura A.7: Componentes óptica de um microscópio eletrônico de transmissão no modo imagem. Adaptado de [230].

A análise de microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). A Figura A.8 mostra o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) *JEOL 2100F* equipado com uma câmera de 11 megapixels CCD (GATAN, Orius), no qual foi utilizado para a caracterização das AuNPs. As imagens MET foram usadas para medir a distribuição estatística dos tamanhos das AuNPs.



Figura A.8: Microscópio eletrônico de transmissão *JEOL 2100F* localizado no Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

A.3.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS ou EDX, do inglês *energy dispersive X-ray*) é uma técnica de microanálise acoplada ao microscópio eletrônico (MET ou MEV - microscópio eletrônico de varredura) que permite a caracterização e análise elementar de materiais [232, 233]. O princípio de funcionamento do EDS se baseia na detecção de raios X emitidos pela amostra durante as transições eletrônicas ocasionadas por um feixe de elétrons [232, 233]. Quando a amostra é excitada pela fonte de energia altamente energética do microscópio, o elétron presente na camada mais interna dos átomos é ejetado formando uma vacância. Dessa forma, um elétron da camada externa preenche essa vacância, ocasionando a emissão de raio X característico [232, 233]. A emissão de radiação equivale à diferença de energia entre as duas camadas, e, como os raios X característicos têm energia correspondente a cada elemento, pode-se identificar a partir do pico de energia as informações sobre a composição química acerca da amostra analisada [232, 233].

A fim de verificar a composição da dispersão coloidais de AuNPs, realizou-se a espectroscopia de energia dispersiva de raios X no Laboratório

Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Para a análise utilizou-se o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) *JEOL 2100F* equipado com uma câmera de 11 megapixels CCD (GATAN, Orius).

A.3.2 Preparação das amostras para TEM e EDS

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e para a espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) utilizou-se a dispersão coloidal de AuNPs com 2mM de NaOH, no qual foi diluída em água ultrapura até obter a absorção igual a 0,25. Foi utilizada a técnica *grid-on-drop* (GOD), em que a grade *holey-carbon* (HC) é colocada sobre a gota de dispersão coloidal de AuNPs com volume igual a 20µl durante 1 minuto. Em seguida, a grade é colocada sobre a gota de água ultrapura com volume igual a 40µl por cerca de 1 minuto. A grade com as AuNPs foram secas à temperatura ambiente e analisadas após 24h.

A.4 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é a técnica para análise de superfícies. O MEV é composto por um canhão de elétrons, lentes eletromagnéticas, uma câmara de vácuo e uma seleção de detectores para coletar os sinais emitidos da amostra [234, 235]. No microscópio de varredura o feixe de elétrons incide sobre a amostra e ao invés de atravessá-la varre a superfície ponto a ponto interagindo com a amostra e extraíndo da sua superfície outros elétrons, denominados de elétrons secundários [234, 235]. Os elétrons secundários geram um sinal luminoso que é convertido em uma imagem. A Figura A.9 mostra o esquema básico de um microscópio de varredura (MEV).

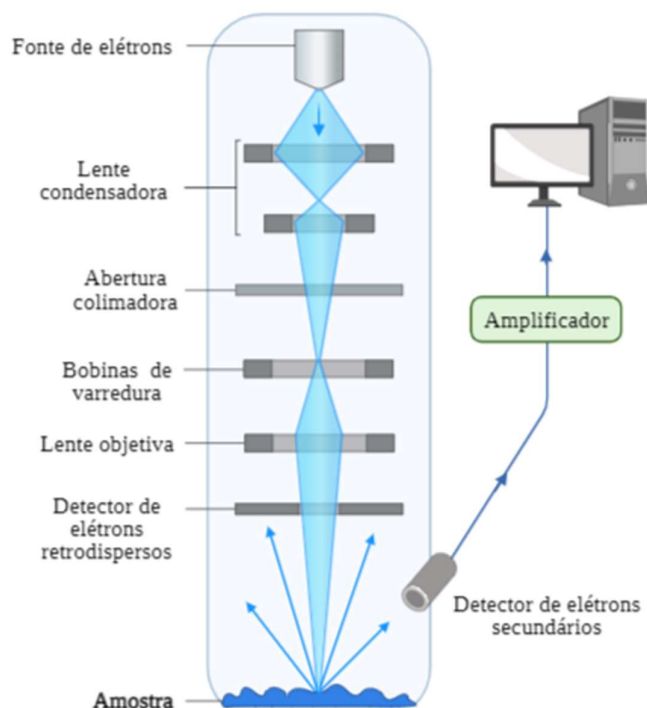


Figura A.9: Esquema básico de um microscópio de varredura (MEV). Adaptado de [234].

A.4.1 Preparação das amostras para MEV

Para o preparo da amostra para a avaliação morfológica por meio da microscopia de varredura (MEV) foram utilizadas lamínulas de vidro circulares com 13mm de diâmetro. No entanto, as lamínulas foram previamente lavadas em etanol 70% a fim de serem esterilizadas quimicamente. Esse procedimento ocorreu na capela de fluxo laminar vertical, e na qual as lamínulas foram deixadas até secar completamente. Posteriormente, a lamínula foi deixada na luz UV por aproximadamente 20min, em cada um dos lados. Em sequência, as lamínulas foram posicionadas na base dos poços da placa de cultura de 24 poços, o qual foi preenchido com 1mL de meio de cultura DMEM-HIGH (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Gibco™) e contendo uma densidade celular igual a $3,0 \times 10^3$ célula/poço das células RAW 264.7. A placa de cultura foi armazenada em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após esse tempo, as células foram tratadas sob a dose do IC₅₀ das AuNPs com 2mM de NaOH na presença e na ausência do Pluronic® F127, isto é, a concentração necessária para reduzir pela metade a atividade enzimática. Como controle da morfologia foi

utilizada a células RAW 264.7 sem nenhum tratamento. As células foram incubadas em uma estufa com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C por 48h.

Decorrido às 48h, as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS estéril a 37°C, a fim de retirar as proteínas provenientes do meio de cultura e soro fetal bovino. Subsequentemente, realizada a fixação (2,5% Glutaraldeído + 4% de Paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M) por 1h em temperatura ambiente (25°C). Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas por três vezes com PBS estéril. Posteriormente, foi realizada a pós-fixação com Ósmio e Ferrocianeto na proporção 1:1 por cerca de 40min. Na sequência, realizou-se a lavagem com PBS estéril (três vezes). Depois, foi realizada a desidratação da amostra com acetona a 30% até 100%, com intervalo de 10min em cada etapa, sendo que na última etapa o processo foi repetido três vezes.

A secagem final da amostra para observação no MEV foi realizada em condições que por ela não passe um menisco de transição de fases evitando as forças resultantes da tensão superficial. Essa condição é obtida na câmara de ponto crítico (em inglês *CPD-Critical Point Dryer – Leica CDP 030*), e, para tanto, leva-se a amostra já fixada e completamente desidratada, à câmara de CPD, em um pequeno volume de acetona. Com a câmara isolada injeta-se o CO₂ líquido (a câmara deve estar à 4-5°C), em que há várias substituições até a remoção total da acetona. Com o posterior aquecimento controlado da câmara o CO₂ torna-se gasoso a uma determinada pressão sem que se forme o menisco de transição e sem que exista a modificação na estrutura do material biológico. Em sequência, a amostra precisa ser montada de modo adequado no suporte porta-amostras do MEV, *stub*, ajustando-se a melhor orientação em relação ao feixe de elétrons e ao coletor (como adesivo utilizou-se fita de dupla face de carbono nos *stubs*).

Por fim, tem-se a metalização da amostra a fim de prover ou aumentar a condutividade da superfície da amostra através de uma fina camada de metal, e no caso do trabalho, a amostra foi recoberta por uma camada de platina com espessura de 5nm. O processo de deposição utilizado foi o *sputtering* (*Leica SCD 500*), no qual a platina foi removida de um eletrodo maciço, por bombardeamento com íons pesados de argônio e depositada sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. Após o processo de metalização, a amostra finalmente está pronta para ser examinada no microscópico eletrônico de varredura para determinação da morfologia celular. A avaliação morfológica foi

realizada no INMETRO, por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) *Magellan 400 FEI Company*.

A.5 Microscópio de fluorescência

A microscopia de fluorescência está correlacionada com o fenômeno de fluorescência, na qual pode ser definido como a emissão da luz no decorrer de nanossegundos logo após a absorção da luz [236, 237]. Em um microscópio de fluorescência, a amostra é iluminada por uma luz com comprimento de onda curto, na qual parte dessa luz é absorvida pela amostra e reemitida como fluorescência [238]. A luz reemitida apresenta um comprimento de onda maior que aquele da luz incidente [238]. O objeto fluorescente é, portanto, visto como uma imagem brilhante contra um fundo escuro, logo, a microscopia de fluorescência demanda que o objeto de estudo fluoresça [236, 238]. A Figura A.10 reporta o arranjo básico de um microscópio de fluorescência.

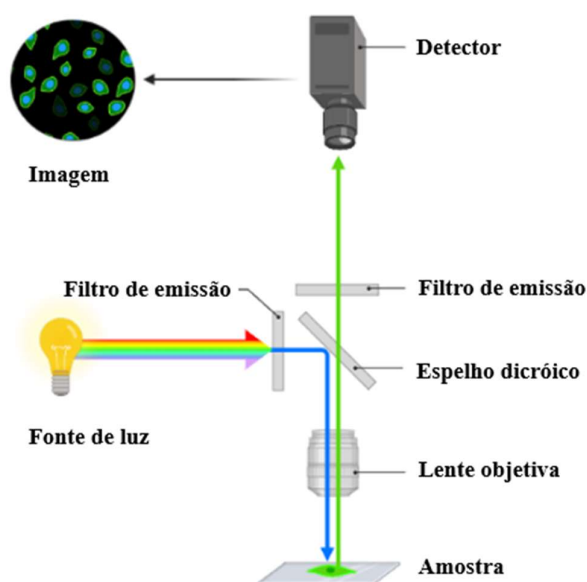


Figura A.10: Esquema básico de um microscópio de fluorescência.

Tipicamente um microscópio de fluorescência contém duas fontes de luz, uma usada para visualização inicial de uma amostra em um modo de luz transmitida e outra usada para excitar e obter o fenômeno de fluorescência, para tanto usa-se, respectivamente, uma lâmpada halógena e uma lâmpada de arco de

mercúrio [239]. A luz excitante, composta por vários comprimentos de onda, é refletida em direção à amostra por um espelho dicróico, e essa luz é absorvida pelo fluoróforos presente na amostra que é objeto de estudo, emitindo, portanto, um feixe de luz de comprimentos de onda mais longos [239]. O microscópio de fluorescência no modo observação de epifluorescência tem o espelho dicróico substituído por um espelho revestido de prata, de modo a refletir e transmitir a luz incidente nas proporções desejadas [239]. Ademais, o filtro de emissão deve ser selecionado para permitir que a luz excitante refletida entre no detector [239].

Para a análise foi utilizado o microscópio óptico de epifluorescência automatizado, *InCell Analyzer 2000*, disponível no Laboratório de Biotecnologia (LABIO) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Esse microscópio é projetado para obter de forma automatizada a captura e análise de células fixadas. Para tanto, é necessário que as células sejam coradas com flurocromos. O *InCell Analyzer 2000* é acoplado com uma câmera CCD que possibilita a captar o sinal proveniente da amostra e transformá-lo em imagem.



Figura A.11: Microscópio óptico de epifluorescência automatizado, *InCell Analyzer 2000*, localizado no Laboratório de Biotecnologia (LABIO) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

A.6 Microscópio óptico invertido de contraste de fase

A microscopia de contraste de fase é uma técnica de microscopia óptica que converte mudanças de fase na luz que passa por uma amostra transparente em

mudanças de brilho na imagem [240]. A luz ao passar pela amostra sofre um retardo correspondente a $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz não desviada, o que resulta em perda de contraste [240]. A fim de corrigir essa defasagem é adicionado um sistema de lentes que transforma as diferenças de fases da luz em diferenças de intensidade luminosa. Dessa forma, a luz atravessa a amostra em quantidades diferentes, gerando diferentes índices de refração [240, 241]. As porções escuras da imagem indicam regiões mais densas da amostra, enquanto as mais claras correspondem a regiões menos densas [241]. Esse tipo de microscópio dispensa o uso de corantes e permitem a observação de células vivas [241].

A.7 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O ensaio de viabilidade celular tem como objetivo avaliar a atividade celular mediante a um determinado tratamento e investigar possíveis efeitos tóxicos que, eventualmente, podem proporcionar a morte celular. O MTT é um ensaio colorimétrico recorrentemente usado para o ensaio de viabilidade [242]. O ensaio de viabilidade celular com MTT avalia a atividade mitocondrial das células de modo que em células metabolicamente ativas ocorre a redução do sal tetrazólio MTT por desidrogenases mitocondriais, gerando formazana, enquanto nas células com atividade mitocondrial reduzidas terá uma redução na geração de formazana o que indica uma redução da atividade celular e, portanto, diminuição de viabilidade celular [242]. A Figura A.12 ilustra a reação de redução do MTT a formazan.

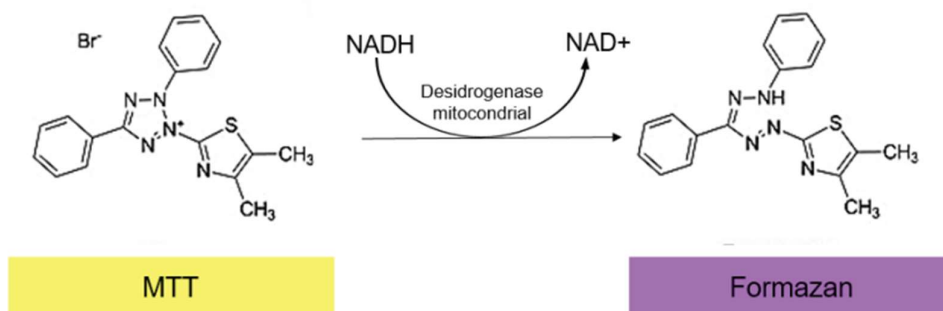


Figura A.12: Redução do MTT a Formazan [242].

A.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio podem ser induzidas por algumas condições de estresse celular, e podem ser precursoras de danos no DNA, proteínas e lipídios com consequências importantes nas células [243, 244]. O reagente permeante celular Dihidroetídio (DHE, 5-etil-5,6-dihidro-6-fenil-3,8-diaminofenantridina, hidroetidina) é um corante fluorogênico que tem sido usado cada vez mais como uma sonda para superóxido em sistemas biológicos [243], [244]. O DHE é um composto hidrofóbico sem carga que é capaz de atravessar membranas extra e intracelulares e, após oxidação, torna-se carregado positivamente e se acumula nas células por intercalação no DNA, principalmente por interações eletrostáticas com grupos fosfato de DNA e posteriormente por interações hidrofóbicas [244]. O corante fluorogênico DHE mostrou ser oxidado por superóxido para formar 2-hidroxi-etídio (excitação: 500-530nm; emissão: 590-620nm) ou por oxidação não específica por outras fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) para formar etídio (excitação: 480nm; emissão: 576nm) [243], [244]. Portanto, uma vez que o DHE é oxidado, há um aumento na fluorescência que pode ser associada às espécies reativas de oxigênio.

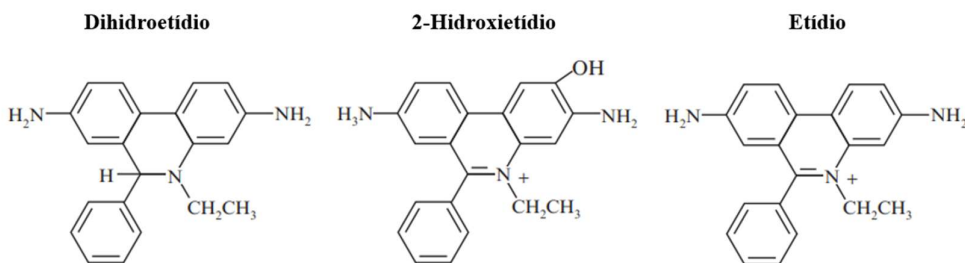


Figura A.13: Estruturas químicas de dihidroetídio, 2-hidroxi-etídio e etídio [245].

A.9 Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

No ensaio da avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio utilizou-se o reagente Griess. O ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess é usado para medir as concentrações de óxido nítrico em soluções líquidas após a reação em nitrito. Nessa técnica o nitrito primeiramente é tratado com um reagente diazotizante, por exemplo, sulfanilamida, em meio ácido para formar um

sal de diazônio transitório [246]. Este intermediário é, então, deixado reagir com um reagente de acoplamento rico em elétrons, N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), para formar um composto azo estável [246]. O produto da reação resulta em uma coloração rósea, cuja intensidade de absorção é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra [246]. Em geral, o produto da reação é detectado a 540nm.

A.10 Preparo do material transparente para análise de Fotoluminescência

A dispersão coloidal de nanopartículas de ouro com volume inicial de 40mL são reduzidas por evaporação até termos 4mL (esse processo demorou cerca de 3 dias, uma vez que usamos a temperatura de aproximadamente, 60°C). Em seguida, esse material é transferido para um microtubo de 2mL e posto em centrifugação. O processo de centrifugação foi repetido 3 vezes no tempo de 1h em cada etapa. A cada 1h de centrifugação foi realizada a separação do sobrenadante do precipitante, em que o material precipitado são as nanopartículas maiores e o sobrenadante com aspecto de um líquido transparente é composto por *clusters*. O sobrenadante é recolocado para centrifugação, enquanto o precipitante é descartado. O processo de separação deve ser realizado com cuidado a fim de não termos a presença das nanopartículas que precipitaram no líquido transparente. Após esse processo, o material está pronto para a realização da análise de fotoluminescência. A concentração de AuNPs antes da separação era igual a 82ppm e depois das etapas de centrifugação o material transparente ficou com concentração igual a 18ppb.

Referências

- [1] World Health Organization, “Coronavirus (COVID-19).” <https://covid19.who.int/> (accessed Jul. 29, 2022).
- [2] World Health Organization, “No TitleWHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.” <https://covid19.who.int/region/amro/country/br> (accessed Jul. 29, 2022).
- [3] R. Otsuka and K. Seino, “Macrophage activation syndrome and COVID-19,” *Inflamm. Regen.*, vol. 40, no. 1, p. 19, Dec. 2020.
- [4] A. Fodor *et al.*, “Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in COVID-19 - Mechanisms and Therapeutic Targets,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2021, no. Dic, 2021.
- [5] S. Meidaninikjeh, N. Sabouni, H. Z. Marzouni, S. Bengar, A. Khalili, and R. Jafari, “Monocytes and macrophages in COVID-19: Friends and foes,” *Life Sci.*, vol. 269, p. 119010, Mar. 2021.
- [6] P. C. Bradshaw, W. A. Seeds, A. C. Miller, V. R. Mahajan, and W. M. Curtis, “COVID-19: Proposing a Ketone-Based Metabolic Therapy as a Treatment to Blunt the Cytokine Storm,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2020, pp. 1–34, Sep. 2020.
- [7] W. Fang *et al.*, “The role of NO in COVID-19 and potential therapeutic strategies,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 163, no. December 2020, pp. 153–162, Feb. 2021.
- [8] M. Aslani, S. S. Mortazavi-Jahromi, and A. Mirshafiey, “Cytokine storm in the pathophysiology of COVID-19: Possible functional disturbances of miRNAs,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 101, no. PA, p. 108172, Dec. 2021.
- [9] A. S. Abouhashem, K. Singh, H. M. E. Azzazy, and C. K. Sen, “Is Low Alveolar Type II Cell SOD3 in the Lungs of Elderly Linked to the Observed Severity of COVID-19?,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 33, no. 2, pp. 59–65, Jul. 2020.
- [10] K. Sharma, A. Koirala, K. Nicolopoulos, C. Chiu, N. Wood, and P. N. Britton, “Vaccines for COVID-19: Where do we stand in 2021?,” *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 39, pp. 22–31, Sep. 2021.
- [11] L. Dai and G. F. Gao, “Viral targets for vaccines against COVID-19,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 2, pp. 73–82, Feb. 2021.
- [12] European Medicines Agency, “Paxlovid,” 2022. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/paxlovid> (accessed Oct. 20, 2022).
- [13] “Paxlovid™,” *ANVISA*, 2022. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/bulas-e-rotulos/bulas-uso-emergencial/medicamentos/paxlovid-paciente> (accessed Oct. 20, 2022).
- [14] C. Gabellieri and H. Frima, “Nanomedicine in the European Commission policy for nanotechnology,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 7, no. 5, pp. 519–520, Oct. 2011.
- [15] P. Boisseau and B. Loubaton, “Nanomedicine, nanotechnology in medicine,” *Comptes Rendus Phys.*, vol. 12, no. 7, pp. 620–636, Sep. 2011.
- [16] L. A. Dykman and N. G. Khlebtsov, *Gold nanoparticles in biomedical applications*. Taylor & Francis, 2017.
- [17] T. L. Doane and C. Burda, “The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy,” *Chem. Soc. Rev.*, vol.

- 41, no. 7, p. 2885, 2012.
- [18] M. S. Rafique *et al.*, “Dependence of the structural optical and thermo-physical properties of gold nano-particles synthesized by laser ablation method on the nature of laser,” *Optik (Stuttg.)*, vol. 134, pp. 140–148, Apr. 2017.
 - [19] M. J. Hajipour *et al.*, “Antibacterial properties of nanoparticles,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 499–511, Oct. 2012.
 - [20] Y.-K. Jo, B. H. Kim, and G. Jung, “Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi,” *Plant Dis.*, vol. 93, no. 10, pp. 1037–1043, Oct. 2009.
 - [21] G. R. and S. D.V.L., “Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L.,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 51, pp. 107–115, Nov. 2013.
 - [22] M. El Zowalaty, N. A. Ibrahim, M. Salama, K. Shameli, M. Usman, and N. Zainuddin, “Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles,” *Int. J. Nanomedicine*, p. 4467, Nov. 2013.
 - [23] M. Lokshyn, V. Lozovski, V. S. Lysenko, V. Piatnytsia, M. Spivak, and V. Sterligov, “Nanoparticles in Antivirus Therapy,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 854, pp. 149–155, Nov. 2013.
 - [24] M. F. Hornos Carneiro and F. Barbosa, “Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects,” *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B*, vol. 19, no. 3–4, pp. 129–148, May 2016.
 - [25] H. Agarwal, A. Nakara, and V. K. Shanmugam, “Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, no. October 2018, pp. 2561–2572, Jan. 2019.
 - [26] E. R. Banerjee, *Perspectives in Translational Research in Life Sciences and Biomedicine*. Singapore: Springer Singapore, 2017.
 - [27] N. Mirghasemzadeh, M. Ghamkhari, and D. Dorrani, “Dependence of Laser Ablation Produced Gold Nanoparticles Characteristics on the Fluence of Laser Pulse,” *Soft Nanosci. Lett.*, vol. 03, no. 04, pp. 101–106, 2013.
 - [28] D. Braguer *et al.*, “Gold nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous biocompatible solutions: assessment of safety and biological identity for nanomedicine applications,” *Int. J. Nanomedicine*, p. 5415, Nov. 2014.
 - [29] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, and M. Sastry, “Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview,” *Langmuir*, vol. 21, no. 23, pp. 10644–10654, Nov. 2005.
 - [30] L. R. A. James, R. Sluyter, C. T. Dillon, and S. F. Ralph, “Effects of Gold Nanoparticles and Gold Anti-Arthritic Compounds on Inflammation Marker Expression in Macrophages,” *Aust. J. Chem.*, vol. 70, no. 9, pp. 1057–1068, 2017.
 - [31] J. S. Ma *et al.*, “Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264.7 cells,” *Nitric Oxide*, vol. 23, no. 3, pp. 214–219, Nov. 2010.
 - [32] M. Kingston, J. C. Pfau, J. Gilmer, and R. Brey, “Selective inhibitory effects of 50-nm gold nanoparticles on mouse macrophage and spleen cells,” *J. Immunotoxicol.*, vol. 13, no. 2, pp. 198–208, 2016.
 - [33] Q. Zhang, V. M. Hitchins, A. M. Schrand, S. M. Hussain, and P. L.

- Goering, "Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators," *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 3, pp. 284–295, Sep. 2011.
- [34] F. Ba Fakih, A. Shanti, C. Stefanini, and S. Lee, "Optimization of Gold Nanoparticles for Efficient Delivery of Catalase to Macrophages for Alleviating Inflammation," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 3, no. 9, pp. 9510–9519, Sep. 2020.
- [35] S. J. Hwang *et al.*, "Green synthesis of gold nanoparticles using chlorogenic acid and their enhanced performance for inflammation," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 7, pp. 1677–1688, Oct. 2015.
- [36] R. G. Nikov, A. S. Nikolov, N. N. Nedyalkov, I. G. Dimitrov, P. A. Atanasov, and M. T. Alexandrov, "Stability of contamination-free gold and silver nanoparticles produced by nanosecond laser ablation of solid targets in water," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 23, pp. 9318–9322, Sep. 2012.
- [37] V. Amendola and M. Meneghetti, "What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution?," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 9, pp. 3027–3046, 2013.
- [38] Tahir, "new paradigm on the pulsed laser ablation of transition metal targets in water: synthesis of carbon sp-sp² hybridized nanomaterial by CO₂/C reduction," PUC - Rio, 2020.
- [39] João Gabriel Giesbrecht Formiga Paiva, "Pulsed Laser Ablation of iron and nickel targets in water and its implications in astrochemistry," PUC - Rio, 2020.
- [40] T. Del Rosso *et al.*, "Synthesis of oxocarbon-encapsulated gold nanoparticles with blue-shifted localized surface plasmon resonance by pulsed laser ablation in water with CO₂ absorbers," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 25, p. 255602, Jun. 2016.
- [41] S. García-Gallego and G. J. L. Bernardes, "Carbon-Monoxide-Releasing Molecules for the Delivery of Therapeutic CO In Vivo," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 53, no. 37, pp. 9712–9721, Sep. 2014.
- [42] M. I. Guillen *et al.*, "The CO-releasing molecule CORM-2 is a novel regulator of the inflammatory process in osteoarthritic chondrocytes," *Rheumatology*, vol. 47, no. 9, pp. 1323–1328, Apr. 2008.
- [43] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, Nov. 2019.
- [44] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, "The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine," *Molecules*, vol. 25, no. 1, p. 112, Dec. 2019.
- [45] B. Ward, "Development, synthesis and characterization of multifunctional nanomaterials," KU Leuven – Faculty of Science, 2014.
- [46] K. McNamara and S. A. M. Tofail, "Nanoparticles in biomedical applications," *Adv. Phys. X*, vol. 2, no. 1, pp. 54–88, Jan. 2017.
- [47] K. Niska, E. Zielinska, M. W. Radomski, and I. Inkielewicz-Stepniak, "Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 295, pp. 38–51, Nov. 2018.
- [48] E. Behzadi *et al.*, "Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 14, pp. 257–270, Dec. 2018.

- [49] A. R. Ribeiro *et al.*, “Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 23615, Apr. 2016.
- [50] H. You, S. Yang, B. Ding, and H. Yang, “Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 7, pp. 2880–2904, 2013.
- [51] C. Dhand *et al.*, “Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 127, pp. 105003–105037, 2015.
- [52] J. K. Patra and K.-H. Baek, “Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques,” *J. Nanomater.*, vol. 2014, pp. 1–12, 2014.
- [53] E. Abbasi *et al.*, “Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties,” *Crit. Rev. Microbiol.*, pp. 1–8, Jun. 2014.
- [54] P. G. Jamkhande, N. W. Ghule, A. H. Bamer, and M. G. Kalaskar, “Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 53, p. 101174, Oct. 2019.
- [55] “Yuri Komatsu Damas Abud Avaliação do efeito de nanopartículas de cloreto de prata e de prata na estrutura celular de bactérias e células de mamíferos Yuri Komatsu Damas Abud Avaliação do efeito de nanopartículas de cloreto de prata e de prata na estrutura,” 2021.
- [56] R. Russo, “Laser ablation in analytical chemistry—a review,” *Talanta*, vol. 57, no. 3, pp. 425–451, May 2002.
- [57] M. Jeyaraj, S. Gurunathan, M. Qasim, M.-H. Kang, and J.-H. Kim, “A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 12, p. 1719, Dec. 2019.
- [58] K. Bloch, K. Pardesi, C. Satriano, and S. Ghosh, “Bacteriogenic Platinum Nanoparticles for Application in Nanomedicine,” *Front. Chem.*, vol. 9, Mar. 2021.
- [59] A. Naganthran *et al.*, “Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles,” *Materials (Basel)*, vol. 15, no. 2, p. 427, Jan. 2022.
- [60] P. R. Willmott and J. R. Huber, “Pulsed laser vaporization and deposition,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 72, no. 1, pp. 315–328, Jan. 2000.
- [61] M. F. F. Becker *et al.*, “Metal nanoparticles generated by laser ablation,” *Nanostructured Mater.*, vol. 10, no. 5, pp. 853–863, Jul. 1998.
- [62] D. Zhang, Z. Li, and K. Sugioka, “Laser ablation in liquids for nanomaterial synthesis: Diversities of targets and liquids,” *JPhys Photonics*, vol. 3, no. 4, 2021.
- [63] M. Condorelli *et al.*, “Nano-Hybrid Au@LCCs Systems Displaying Anti-Inflammatory Activity,” *Materials (Basel)*, vol. 15, no. 10, p. 3701, May 2022.
- [64] V. Amendola, P. Riello, and M. Meneghetti, “Magnetic Nanoparticles of Iron Carbide, Iron Oxide, Iron@Iron Oxide, and Metal Iron Synthesized by Laser Ablation in Organic Solvents,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 12, pp. 5140–5146, Mar. 2011.
- [65] D. Fulvio, L. Fuks Maron, Y. Cires Perez, Tahir, and T. Del Rosso, “Micrometeorite bombardment simulated by ns-pulsed laser ablation:

- Morphological characterization of the impact craters,” *Icarus*, vol. 366, no. May, p. 114532, Sep. 2021.
- [66] J. Cheung and J. Horwitz, “Pulsed Laser Deposition History and Laser-Target Interactions,” *MRS Bull.*, vol. 17, no. 2, pp. 30–36, 1992.
- [67] X. Liu, D. Du, and G. Mourou, “Laser ablation and micromachining with ultrashort laser pulses,” *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 33, no. 10, pp. 1706–1716, 1997.
- [68] R. Hibst and U. Keller, “Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 338–344, 1989.
- [69] S. H. Chung and E. Mazur, “Surgical applications of femtosecond lasers,” *J. Biophotonics*, vol. 2, no. 10, pp. 557–572, 2009.
- [70] M. Chakravarthi, R. Shilpakar, and K. . Shankar, “Carbon dioxide laser guidelines,” *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, vol. 2, no. 2, pp. 72–79, 2009.
- [71] S. Siano *et al.*, “Laser cleaning in conservation of stone, metal, and painted artifacts: State of the art and new insights on the use of the Nd:YAG lasers,” *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 106, no. 2, pp. 419–446, 2012.
- [72] D. Perez and L. J. Lewis, “Molecular-dynamics study of ablation of solids under femtosecond laser pulses,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 67, no. 18, 2003.
- [73] B. Jaeggi, B. Neuenschwander, M. Schmid, M. Muralt, J. Zuercher, and U. Hunziker, “Influence of the pulse duration in the ps-regime on the ablation efficiency of metals,” *Phys. Procedia*, vol. 12, no. PART 2, pp. 164–171, 2011.
- [74] B. Zheng, G. Jiang, W. Wang, K. Wang, and X. Mei, “Ablation experiment and threshold calculation of titanium alloy irradiated by ultra-fast pulse laser,” *AIP Adv.*, vol. 4, no. 3, 2014.
- [75] A. Semerok *et al.*, “Experimental investigations of laser ablation efficiency of pure metals with femto, pico and nanosecond pulses,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 138–139, no. 1–4, pp. 311–314, 1999.
- [76] M. Hashida, A. F. Semerok, O. Gobert, G. Petite, Y. Izawa, and J. F. Wagner, “Ablation threshold dependence on pulse duration for copper,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 197–198, pp. 862–867, 2002.
- [77] V. Amendola and M. Meneghetti, “Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, pp. 3805–3821, 2009.
- [78] F. Taccogna, “Nucleation and growth of nanoparticles in a plasma by laser ablation in liquid,” *J. Plasma Phys.*, vol. 81, no. 5, pp. 1–12, 2015.
- [79] M. Kim, S. Osone, T. Kim, H. Higashi, and T. Seto, “Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review,” *KONA Powder Part. J.*, vol. 2017, no. 34, pp. 80–90, 2017.
- [80] M. Loa, S. Diego, and C. D. Keeling, “in Brief in Brief in Brief,” *Prim. Heal. Care*, vol. 16, no. 8, pp. 4–4, 2006.
- [81] A. V. Simakin *et al.*, “The Effect of Gold Nanoparticle Concentration and Laser Fluence on the Laser-Induced Water Decomposition,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 123, no. 8, pp. 1869–1880, Feb. 2019.
- [82] S. Pommeret, F. Gobert, M. Mostafavi, I. Lampre, and J.-C. Mialocq, “Femtochemistry of the Hydrated Electron at Decimolar Concentration,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 105, no. 51, pp. 11400–11406, Dec. 2001.

- [83] J. M. P. Almeida, G. F. B. Almeida, L. Boni, and C. R. Mendonça, "Nonlinear optical properties and femtosecond laser micromachining of special glasses," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 26, no. 12, pp. 2418–2429, 2015.
- [84] Al-Haddad, D. R. M. S, D. I. M. Ibrahim, and A. H. Khalid, "The Study of the Nonlinear Optical Properties of Copper Nanoparticle Prepared By Pulse Laser Ablation PLA .," *Int. J. Eng. Res. Appl.*, vol. 4, no. 5, pp. 89–96, 2014.
- [85] S. A. Vanalakar *et al.*, "A review on pulsed laser deposited CZTS thin films for solar cell applications," *J. Alloys Compd.*, vol. 619, pp. 109–121, 2015.
- [86] A. Miotello and R. Kelly, "Laser-induced phase explosion: New physical problems when a condensed phase approaches the thermodynamic critical temperature," *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 69, no. 7, pp. 67–73, 1999.
- [87] T. Sakka, S. Iwanaga, Y. H. Ogata, A. Matsunawa, and T. Takemoto, "Laser ablation at solid-liquid interfaces: An approach from optical emission spectra," *J. Chem. Phys.*, vol. 112, no. 19, pp. 8645–8653, 2000.
- [88] R. Fabbro, J. Fournier, P. Ballard, D. Devaux, and J. Virmont, "Physical study of laser-produced plasma in confined geometry," *J. Appl. Phys.*, vol. 68, no. 2, pp. 775–784, 1990.
- [89] T. E. Itina, "On Nanoparticle Formation by Laser Ablation in Liquids," *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 12, pp. 5044–5048, Mar. 2011.
- [90] A. De Giacomo, M. Dell'Aglia, O. De Pascale, and M. Capitelli, "From single pulse to double pulse ns-Laser Induced Breakdown Spectroscopy under water: Elemental analysis of aqueous solutions and submerged solid samples," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, no. 8, pp. 721–738, 2007.
- [91] P. Wagener, S. Ibrahimkuty, A. Menzel, A. Plech, and S. Barcikowski, "Dynamics of silver nanoparticle formation and agglomeration inside the cavitation bubble after pulsed laser ablation in liquid," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 9, pp. 3068–3074, 2013.
- [92] M. R. Kalus, R. Lanyumba, S. Barcikowski, and B. Gökce, "Discrimination of ablation, shielding, and interface layer effects on the steady-state formation of persistent bubbles under liquid flow conditions during laser synthesis of colloids," *J. Flow Chem.*, vol. 11, no. 4, pp. 773–792, 2021.
- [93] M. R. Kalus *et al.*, "Determining the role of redox-active materials during laser-induced water decomposition," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 21, no. 34, pp. 18636–18651, 2019.
- [94] J. Kim, D. Amaranatha Reddy, R. Ma, and T. K. Kim, "The influence of laser wavelength and fluence on palladium nanoparticles produced by pulsed laser ablation in deionized water," *Solid State Sci.*, vol. 37, pp. 96–102, 2014.
- [95] Y. Tomita, M. Tsubota, and N. An-Naka, "Energy evaluation of cavitation bubble generation and shock wave emission by laser focusing in liquid nitrogen," *J. Appl. Phys.*, vol. 93, no. 5, pp. 3039–3048, 2003.
- [96] J. P. Sylvestre, S. Poulin, A. V. Kabashin, E. Sacher, M. Meunier, and J. H. T. Luong, "Surface chemistry of gold nanoparticles produced by laser ablation in aqueous media," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 43, pp. 16864–16869, 2004.
- [97] H. Muto, K. Yamada, K. Miyajima, and F. Mafuné, "Estimation of surface

- oxide on surfactant-free gold nanoparticles laser-ablated in water,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 46, pp. 17221–17226, 2007.
- [98] V. Amendola *et al.*, “Room-Temperature Laser Synthesis in Liquid of Oxide, Metal-Oxide Core-Shells, and Doped Oxide Nanoparticles,” *Chem. – A Eur. J.*, vol. 26, no. 42, pp. 9206–9242, Jul. 2020.
- [99] M. Kalus, “Discrimination of physical and chemical effects during Laser Synthesis of Colloids Dissertation,” University of Duisburg-Essen, 2020.
- [100] J. Wu, Y. Huang, W. Ye, and Y. Li, “CO₂ Reduction: From the Electrochemical to Photochemical Approach,” *Adv. Sci.*, vol. 4, no. 11, p. 1700194, Nov. 2017.
- [101] R. K. Thauer, K. Jungermann, and K. Decker, “Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria,” *Bacteriol. Rev.*, vol. 41, no. 1, pp. 100–180, 1977.
- [102] H. Mistry *et al.*, “Exceptional size-dependent activity enhancement in the electroreduction of CO₂ over Au nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 47, pp. 16473–16476, 2014.
- [103] A. De Giacomo *et al.*, “Cavitation dynamics of laser ablation of bulk and wire-shaped metals in water during nanoparticles production,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 9, pp. 3083–3092, 2013.
- [104] M. R. Kalus, N. Bärsch, R. Streubel, E. Gökce, S. Barcikowski, and B. Gökce, “How persistent microbubbles shield nanoparticle productivity in laser synthesis of colloids - Quantification of their volume, dwell dynamics, and gas composition,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 10, pp. 7112–7123, 2017.
- [105] Y. Hori, A. Murata, K. Kikuchi, and S. Suzuki, “Electrochemical reduction of carbon dioxides to carbon monoxide at a gold electrode in aqueous potassium hydrogen carbonate,” *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 10, p. 728, 1987.
- [106] R. de Levie, “The electrolysis of water,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 476, no. 1, pp. 92–93, Oct. 1999.
- [107] O. Diaz-Morales, F. Calle-Vallejo, C. de Munck, and M. T. M. Koper, “Electrochemical water splitting by gold: evidence for an oxide decomposition mechanism,” *Chem. Sci.*, vol. 4, no. 6, p. 2334, 2013.
- [108] Y. Chen, C. W. Li, and M. W. Kanan, “Aqueous CO₂ Reduction at Very Low Overpotential on Oxide-Derived Au Nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 49, pp. 19969–19972, Dec. 2012.
- [109] V. Dolique, A.-L. Thomann, E. Millon, A. Petit, and P. Brault, “About the key factors driving the resistivity of AuOx thin films grown by reactive magnetron sputtering,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 295, pp. 194–197, Mar. 2014.
- [110] H. Tsai, E. Hu, K. Perng, M. Chen, J.-C. Wu, and Y.-S. Chang, “Instability of gold oxide Au₂O₃,” *Surf. Sci.*, vol. 537, no. 1–3, pp. L447–L450, Jul. 2003.
- [111] H. Shi, R. Asahi, and C. Stampfl, “Properties of the gold oxides Au₂O₃ and Au₂O: First-principles investigation,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 75, no. 20, pp. 1–8, 2007.
- [112] N. S. Romero Cuellar *et al.*, “Two-step electrochemical reduction of CO₂ towards multi-carbon products at high current densities,” *J. CO₂ Util.*, vol. 36, no. June 2019, pp. 263–275, 2020.
- [113] D. M. Drab *et al.*, “Hydrocarbon synthesis from carbon dioxide and hydrogen: A two-step process,” *Energy and Fuels*, vol. 27, no. 11, pp.

- 6348–6354, 2013.
- [114] S. Roy, A. Cherevotan, and S. C. Peter, “Thermochemical CO₂ Hydrogenation to Single Carbon Products: Scientific and Technological Challenges,” *ACS Energy Lett.*, vol. 3, no. 8, pp. 1938–1966, 2018.
 - [115] B. Pan, J. Xiao, J. Li, P. Liu, C. Wang, and G. Yang, “Carbyne with finite length: The one-dimensional sp carbon,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, Oct. 2015.
 - [116] H. Yu, X. Li, X. Zeng, and Y. Lu, “Preparation of carbon dots by non-focusing pulsed laser irradiation in toluene,” *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 4, pp. 819–822, 2016.
 - [117] S. H. Lee, H. J. Jung, S. J. Lee, J. Theerthagiri, T. H. Kim, and M. Y. Choi, “Selective synthesis of Au and graphitic carbon-encapsulated Au (Au@GC) nanoparticles by pulsed laser ablation in solvents: Catalytic Au and acid-resistant Au@GC nanoparticles,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 506, p. 145006, 2020.
 - [118] I. Llamas-Jansa, C. Jäger, H. Mutschke, and T. Henning, “Far-ultraviolet to near-infrared optical properties of carbon nanoparticles produced by pulsed-laser pyrolysis of hydrocarbons and their relation with structural variations,” *Carbon N. Y.*, vol. 45, no. 7, pp. 1542–1557, 2007.
 - [119] T. Del Rosso *et al.*, “Synthesis of oxocarbon-encapsulated gold nanoparticles with blue-shifted localized surface plasmon resonance by pulsed laser ablation in water with CO₂ absorbers,” *Nanotechnology*, vol. 27, no. 25, p. 255602, Jun. 2016.
 - [120] L. S. Nobre, J. D. Seixas, C. C. Romão, and L. M. Saraiva, “Antimicrobial action of carbon monoxide-releasing compounds,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 12, pp. 4303–4307, 2007.
 - [121] M. G. Bani-Hani, D. Greenstein, B. E. Mann, C. J. Green, and R. Motterlini, “Modulation of thrombin-induced neuroinflammation in BV-2 microglia by carbon monoxide-releasing molecule 3,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 318, no. 3, pp. 1315–1322, 2006.
 - [122] R. Foresti *et al.*, “Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 142, no. 3, pp. 453–460, 2004.
 - [123] S. Chlopicki, R. Olszanecki, E. Marcinkiewicz, M. Lomnicka, and R. Motterlini, “Carbon monoxide released by CORM-3 inhibits human platelets by a mechanism independent of soluble guanylate cyclase,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 71, no. 2, pp. 393–401, 2006.
 - [124] L. E. Otterbein, R. Foresti, and R. Motterlini, “Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act between Danger Signaling and Pro-Survival,” *Circ. Res.*, vol. 118, no. 12, pp. 1940–1959, 2016.
 - [125] T. Dieing, O. Hollricher, and J. Toporski, *Springer Series in Optical Sciences: Preface*, vol. 158. 2010.
 - [126] M. S. Rodrigues, J. Borges, C. Lopes, R. M. S. Pereira, M. I. Vasilevskiy, and F. Vaz, “Gas sensors based on localized surface plasmon resonances: Synthesis of oxide films with embedded metal nanoparticles, theory and simulation, and sensitivity enhancement strategies,” *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 12, 2021.
 - [127] D. Schaming and H. Remita, “Nanotechnology: from the ancient time to nowadays,” *Found. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 187–205, 2015.
 - [128] F. L. Maximino, “Caracterização de Plasmons de Superfície em filmes de

- metais nobres através de tunelamento ótico,” Universidade de São Paulo, 2011.
- [129] Quinten and Michael, *Optical Properties of Nanoparticle Systems: Mie and Beyond - Michael Quinten - Google Bøger*. 2011. [Online]. Available: https://books.google.dk/books?hl=da&lr=&id=X9hDAfDAP-kC&oi=fnd&pg=PR13&dq=Michael+Quinten.+Optical+properties+of+nano+particle+systems+:+Mie+and+beyond.+Wiley,+2011.&ots=wgkR-jP5hg&sig=VVyZmfU3ckQVtO0ysb4mlfQ5zSE&redir_esc=y#v=onepage&q=Michael+Quinten. Op.
- [130] S. a Maier, *Fundamentals and Applications Plasmonics : Fundamentals and Applications*, vol. 677, no. 1. 2004. [Online]. Available: <http://elib.tu-darmstadt.de/tocs/95069577.pdf>
- [131] A. V. Andrade-Neto, A. Ribeiro Neto, and A. Jorio, “Relação de dispersão para os plásmo-polártons de superfície em uma interface plana metal/dielétrico,” *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 39, no. 3, 2017.
- [132] Q. Zaman, “Surface Plasmon Resonance Spectroscopy for the Characterization of Nanoparticles , Organics Thin Films and 2-D Materials,” PUC-Rio, 2019.
- [133] T. De Doutorado, “Alexandre de Resende Camara Biossensor e Dispositivo Eletro-óptico em Fibras Ópticas Especiais Alexandre de Resende Camara Biossensor e Dispositivo Eletro-óptico em Fibras Ópticas Especiais,” vol. I, 2015.
- [134] V. Amendola and M. Meneghetti, “Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 11, pp. 4277–4285, 2009.
- [135] P. Rostron, S. Gaber, and D. Gaber, “Raman Spectroscopy , Review,” no. October, 2016.
- [136] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, and C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition*. 2003.
- [137] M. A. Hazle, M. Mehicic, D. J. Gardiner, and P. R. Graves, *Practical Raman Spectroscopy: Springer Verlag, Berlin, 1989 (ISBN 3-540-50254-8). viii+ 157 pp. Price DM 78.00*, vol. 1, no. 1. 1990.
- [138] A. N. Paršin, “On the arithmetic of two-dimensional schemes. I. distributions and residues,” *Math. USSR - Izv.*, vol. 10, no. 4, pp. 695–729, 1976.
- [139] M. Schlösser, “Theory of Quantitative Raman Spectroscopy,” pp. 53–74, 2014.
- [140] S. K. L. Gomez, “Desenvolvimento e aplicações da técnica espectroscopia Raman anti-Stokes coerente multiplex,” 2018.
- [141] R. Pilot, R. Signorini, and L. Fabris, “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Principles, Substrates, and Applications,” in *Metal Nanoparticles and Clusters*, Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 89–164.
- [142] L. He, “Elaboration and assessment of a new Ag⁰ / TiO₂ heterostructure intended to the label-free SERS detection of DNA To cite this version : HAL Id : tel-01170993 Élaboration et évaluation d ’ une nouvelle hétérostructure Ag⁰/TiO₂ destinée à la détection p,” 2015.
- [143] J. Cejkova, V. Prokopec, S. Brazdova, A. Kokaislova, P. Matejka, and F. Stepanek, “Characterization of copper SERS-active substrates prepared by electrochemical deposition,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 18, pp. 7864–

- 7870, 2009.
- [144] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, and L. Fabris, “A review on surface-enhanced Raman scattering,” *Biosensors*, vol. 9, no. 2, 2019.
 - [145] L. Peixoto, J. Santos, and G. Andrade, “Biossensores Plasmônicos Baseados Em Espalhamento Raman Intensificado Por Superfície Utilizando Nanobastões De Ouro,” *Quim. Nova*, vol. 42, no. 9, pp. 1044–1049, 2019.
 - [146] R. R. Arvizo, S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, K. Giri, R. Bhattacharya, and P. Mukherjee, “Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2943–2970, 2012.
 - [147] R. Etienne, F. P. Dias Viegas, and C. Viegas, “Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview,” *Rev. Virtual Quim.*, vol. 13, no. 1, pp. 167–191, 2021.
 - [148] S. L. Robbins, V. Kumar, A. K. Abbas, and J. C. Aster, *Robbins Basic Pathology*. 2013.
 - [149] N. Fujiwara and K. Kobayashi, “Macrophages in inflammation,” *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, vol. 4, no. 3, pp. 281–286, 2005.
 - [150] B. Alberts *et al.*, *Biologia Molecular da Célula*. Artmed, 2017.
 - [151] G. B. Ryan and G. Majno, “Acute inflammation. A review.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 86, no. 1, pp. 183–276, 1977, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/64118%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2032041>.
 - [152] K. Srisook *et al.*, “CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O₂– and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 71, no. 3, pp. 307–318, Jan. 2006.
 - [153] N. T. Ashley, Z. M. Weil, and R. J. Nelson, “Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation,” *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, vol. 43, no. August, pp. 385–406, 2012.
 - [154] B. Mayer and B. Hemmens, “Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 22, no. 12, pp. 477–481, 1997.
 - [155] B. M. Bakadia, B. O. O. Boni, A. A. Q. Ahmed, and G. Yang, “The impact of oxidative stress damage induced by the environmental stressors on COVID-19,” *Life Sci.*, vol. 264, no. September 2020, p. 118653, 2021.
 - [156] N. F. Cerqueira and W. B. Yoshida, “ÓXIDO NÍTRICO. REVISÃO”.
 - [157] M. A. S. SANSON, “AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO E POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO,” Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.
 - [158] B. R. B. GOMES, “Análise da produção de Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos,” UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2017.
 - [159] U. Saqib, S. Sarkar, K. Suk, O. Mohammad, M. S. Baig, and R. Savai, “Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 25, pp. 17937–17950, 2018.
 - [160] E. M. dos S. F. T. Neves, “Macrófago: Biologia, Diversidade e Função,” Universidade Fernando Pessoa, 2015.
 - [161] D. M. Mosser and J. P. Edwards, “Exploring the full spectrum of macrophage activation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969,

- 2008.
- [162] J. W. Pollard, “Trophic macrophages in development and disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 4, pp. 259–270, 2009.
 - [163] P. Song, W. Li, J. Xie, Y. Hou, and C. You, “Cytokine storm induced by SARS-CoV-2,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 509, pp. 280–287, Oct. 2020.
 - [164] M. S. Diamond and T. D. Kanneganti, “Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2,” *Nat. Immunol.*, vol. 23, no. 2, pp. 165–176, 2022.
 - [165] L. Vanderbeke *et al.*, “Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2021.
 - [166] L. F. García, “Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. June, pp. 4–8, 2020.
 - [167] R. J. Dress and F. Ginhoux, “Monocytes and macrophages in severe COVID-19 – friend, foe or both?,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 99, no. 6, pp. 561–564, 2021.
 - [168] S. R. Paludan and T. H. Mogensen, “Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis,” *Sci. Immunol.*, vol. 7, no. 67, 2022, doi: 10.1126/sciimmunol.abm5505.
 - [169] M. Merad and J. C. Martin, “Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 6, pp. 355–362, 2020.
 - [170] L. Y. C. Chen, R. L. Hoiland, S. Stukas, C. L. Wellington, and M. S. Sekhon, “Confronting the controversy: Interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome,” *Eur. Respir. J.*, vol. 56, no. 4, 2020.
 - [171] C. R. do Nascimento, J. M. Santos, S. B. P. Brito, and P. P. Tenório, “Quais são os mecanismos celulares relacionados aos eventos tromboembólicos em pacientes com COVID-19?,” *J. Vasc. Bras.*, vol. 20, 2021.
 - [172] M. Premkumar and C. K. Kedarisetty, “Cytokine storm of covid-19 and its impact on patients with and without chronic liver disease,” *J. Clin. Transl. Hepatol.*, vol. 9, no. 2, pp. 256–264, 2021.
 - [173] Food and Drug Administration, “Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19,” *FDA NEWS RELEASE*. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19> (accessed Oct. 20, 2022).
 - [174] R. P. Nishanth, R. G. Jyotsna, J. J. Schlager, S. M. Hussain, and P. Reddanna, “Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway,” *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 4, pp. 502–516, 2011.
 - [175] M. Kingston, J. C. Pfau, J. Gilmer, and R. Brey, “Selective inhibitory effects of 50-nm gold nanoparticles on mouse macrophage and spleen cells,” *J. Immunotoxicol.*, vol. 13, no. 2, pp. 198–208, Mar. 2016.
 - [176] L. R. A. James, R. Sluyter, C. T. Dillon, and S. F. Ralph, “Effects of Gold Nanoparticles and Gold Anti-Arthritic Compounds on Inflammation Marker Expression in Macrophages,” *Aust. J. Chem.*, vol. 70, no. 9, p. 1057, 2017.
 - [177] R. P. Nishanth, R. G. Jyotsna, J. J. Schlager, S. M. Hussain, and P. Reddanna, “Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway,”

- Nanotoxicology*, vol. 5, no. 4, pp. 502–516, Dec. 2011.
- [178] K. Tyner, S. Bancos, and D. Stevens, “Effect of silica and gold nanoparticles on macrophage proliferation, activation markers, cytokine production, and phagocytosis in vitro,” *Int. J. Nanomedicine*, p. 183, Dec. 2014.
- [179] A. R. Fernandes *et al.*, “Improving the Anti-inflammatory Response via Gold Nanoparticle Vectorization of CO-Releasing Molecules,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, no. 2, pp. 1090–1101, 2020.
- [180] L. Li, A. Hsu, and P. K. Moore, “Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation — a tale of three gases!,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 123, no. 3, pp. 386–400, Sep. 2009.
- [181] M. R. D. L. ZANETTI, “BIOCOMPATIBILIZAÇÃO DE NANOBASTÕES DE OURO COM USO DE COPOLÍMERO EM BLOCO,” Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.
- [182] E. V. Batrakova and A. V. Kabanov, “Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers,” *J. Control. Release*, vol. 130, no. 2, pp. 98–106, 2008.
- [183] J. E. Matthew, Y. L. Nazario, S. C. Roberts, and S. R. Bhatia, “Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic® F127,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 23, pp. 4615–4619, 2002.
- [184] M. L. Kang *et al.*, “Pluronic® F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of Bordetella bronchiseptica antigens containing dermonecrototoxin,” *Vaccine*, vol. 25, no. 23, pp. 4602–4610, 2007.
- [185] S. F. Khattak, S. R. Bhatia, and S. C. Roberts, “Pluronic F127 as a Cell Encapsulation Material: Utilization of Membrane-Stabilizing Agents,” *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 5–6, pp. 974–983, May 2005.
- [186] T. Simon, S. Boca, D. Biro, P. Baldeck, and S. Astilean, “Gold-Pluronic core-shell nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 4, 2013.
- [187] T. Simon, M. Potara, A.-M. Gabudean, E. Licarete, M. Banciu, and S. Astilean, “Designing Theranostic Agents Based on Pluronic Stabilized Gold Nanoaggregates Loaded with Methylene Blue for Multimodal Cell Imaging and Enhanced Photodynamic Therapy,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 30, pp. 16191–16201, Aug. 2015.
- [188] T. Del Rosso *et al.*, “Biocompatible Au@Carbynoid/Pluronic-F127 nanocomposites synthesized by pulsed laser ablation assisted CO 2 recycling,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 441, pp. 347–355, May 2018.
- [189] S. Kamali, E. Solati, and D. Dorrani, “Effect of Laser Fluence on the Characteristics of Graphene Nanosheets Produced by Pulsed Laser Ablation in Water,” *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 86, no. 2, pp. 238–243, 2019.
- [190] D. Pavia, G. Lampman, G. Kriz, and J. Vyvyan, “Introdução à espectroscopia,” *Cengage Learn.*, p. 700, 2012.
- [191] H.-H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992.
- [192] A. L. Galo and M. F. Colombo, “Long optical path length spectrophotometry in conventional double-beam spectrophotometers: A simple alternative for investigating samples of very low optical density,” *Quim. Nova*, vol. 32, no. 2, pp. 488–492, 2009.

- [193] B. Pénicaud, C. Bonnefoy, C. Moesch, and G. Lachâtre, “Spectrométrie de Masse à Plasma couplé par induction (ICP-MS) Potentialités en analyse et en biologie,” *Ann. Pharm. Françaises*, vol. 64, no. 5, pp. 312–327, 2006.
- [194] M. F. Al-Hakkani, “Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry ‘ICP-MS’: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters,” *SN Appl. Sci.*, vol. 1, no. 7, pp. 1–15, 2019.
- [195] L. E. Garcia-Amezquita, J. Welte-Chanes, F. T. Vergara-Balderas, and D. Bermúdez-Aguirre, “Freeze-drying: The Basic Process,” in *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, 2016, pp. 104–109.
- [196] F. Wang, X. K. Liu, and F. Gao, *Fundamentals of solar cells and light-emitting diodes*. Elsevier Inc., 2019.
- [197] R. E. Aderne, “Desenvolvimento e caracterização de OLEDs no infravermelho próximo e de dispositivos orgânicos de up-conversion do infravermelho próximo para o visível,” PUC-Rio, 2018.
- [198] P.-S. Hung, Y.-C. Kuo, H.-G. Chen, H.-H. K. Chiang, and O. K.-S. Lee, “Detection of Osteogenic Differentiation by Differential Mineralized Matrix Production in Mesenchymal Stromal Cells by Raman Spectroscopy,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e65438, May 2013.
- [199] L. M. Xavier and P. W. Carvalho, “Física Da Difração De Raios X Aplicada a Engenharia Ambiental,” *Rev. Eletrônica Científica Inovação e Tecnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 14–17, 2013.
- [200] K. S. Louis and A. C. Siegel, “Chapter 2,” vol. 740, no. 1, pp. 7–12.
- [201] H. FERREIRA, “Viabilidade celular para prognóstico de efeitos colaterais em radioterapia de câncer de laringe,” Universidade Federal de Pernambuco, 2012. [Online]. Available: <http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12343>
- [202] L. C. DA SILVA, “EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA EM MELANÓCITOS MURINOS B16F10,” Universidade Federal do Paraná, 2014.
- [203] A. C. Chien, N. S. Hill, and P. A. Levin, “Cell size control in bacteria,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. R340–R349, 2012.
- [204] Thermo Fisher Scientific, “Hoechst 33342.” <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62249> (accessed Mar. 10, 2022).
- [205] M. F. Hornos Carneiro and F. Barbosa, “Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects,” *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.*, vol. 19, no. 3–4, pp. 129–148, 2016.
- [206] Q. Zaman *et al.*, “Two-color surface plasmon resonance nanosizer for gold nanoparticles,” *Opt. Express*, vol. 27, no. 3, p. 3200, Feb. 2019.
- [207] J. D. Clogston and A. K. Patri, “Zeta potential measurement,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 697, pp. 63–70, 2011.
- [208] L. Wu, J. Zhang, and W. Watanabe, “Physical and chemical stability of drug nanoparticles,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 6, pp. 456–469, May 2011.
- [209] M. Usman *et al.*, “The effect of surface charge on cellular uptake and inflammatory behavior of carbon dots,” *Colloid Interface Sci. Commun.*, vol. 35, p. 100243, Mar. 2020.
- [210] A. E. Ferreira Oliveira, A. César Pereira, G. Braga Bettio, and C. R. Teixeira Tarley, “Synthesis, Studies and Structural characterization of

- Thermal and Hydrazine Reduction of Graphene Oxide by Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy,” *Rev. Virtual Química*, vol. 11, no. 3, pp. 866–877, 2019.
- [211] R. D. Bowen, H. G. M. Edwards, and T. Varnali, “Influence of a methyl substituent on the Raman spectrum of but-3-enyl methyl ether,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 93, pp. 26–32, Jul. 2012.
- [212] zimmerpeacock, “Carbon dioxide equilibrium in water/aqueous systems.” <https://www.zimmerpeacocktech.com/knowledge-base/faq/ph-co2-equilibrium/> (accessed Aug. 25, 2022).
- [213] S. Wang *et al.*, “Delicate changes of bioapatite mineral in pig femur with addition of dietary xylooligosaccharide: Evidences from Raman spectroscopy and ICP,” *Anim. Sci. J.*, vol. 88, no. 11, pp. 1820–1826, Nov. 2017.
- [214] T. A. Adekiya, P. Kumar, P. P. D. Kondiah, P. Ubanako, and Y. E. Choonara, “In Vivo Evaluation of Praziquantel-Loaded Solid Lipid Nanoparticles against *S. mansoni* Infection in Preclinical Murine Models,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 16, p. 9485, Aug. 2022.
- [215] E. Solati and D. Dorrnanian, “Comparison Between Silver and Gold Nanoparticles Prepared by Pulsed Laser Ablation in Distilled Water,” *J. Clust. Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 727–742, May 2015.
- [216] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential – What they are and what they are not?,” *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, Aug. 2016.
- [217] J. F. D. F. Araujo *et al.*, “Novel scanning magnetic microscopy method for the characterization of magnetic nanoparticles,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 499, p. 166300, Apr. 2020.
- [218] T. Del Rosso *et al.*, “Biocompatible Au@Carbynoid/Pluronic-F127 nanocomposites synthesized by pulsed laser ablation assisted CO2 recycling,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 441, pp. 347–355, May 2018.
- [219] Q. Zhang, V. M. Hitchins, A. M. Schrand, S. M. Hussain, and P. L. Goering, “Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators,” *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 3, pp. 284–295, 2011.
- [220] A. A. Bunaciu, E. gabriela Udriștioiu, and H. Y. Aboul-Enein, “X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 45, no. 4, pp. 289–299, 2015.
- [221] J. Epp, *X-Ray Diffraction (XRD) Techniques for Materials Characterization*. Elsevier Ltd, 2016.
- [222] G. Hultquist and C. Leygraf, *Materials Science and Eng.*, vol. 42, no. 1. 1980.
- [223] S. Falke and C. Betzel, *Dynamic Light Scattering (DLS)*. Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-28247-9_6.
- [224] F. Babick, *Dynamic light scattering (DLS)*. Elsevier Inc., 2019.
- [225] S. Falke and C. Betzel, “Dynamic Light Scattering (DLS),” 2019, pp. 173–193.
- [226] E. L. G. Dialetachi, “Espalhamento Dinâmico de Luz em Sistemas Coloidais Diluídos,” Universidade de São Paulo, 2017.
- [227] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S. M. Ansar, A. Paredes, and T. Ingle, *Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges*. Elsevier Inc., 2018.

- [228] A. J. Shnoudeh *et al.*, *Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles*. Elsevier Inc., 2019.
- [229] J. D. Clogston and A. K. Patri, “Zeta Potential Measurement,” 2011, pp. 63–70.
- [230] J. M. Zuo and J. C. H. Spence, *Advanced Transmission Electron Microscopy*. New York, NY: Springer New York, 2017.
- [231] P. J. Goodhew, “General Introduction to Transmission Electron Microscopy TEM,” *Aberration-Corrected Anal. Transm. Electron Microsc.*, no. October, pp. 1–19, 2011.
- [232] D. Shindo and T. Oikawa, *Analytical Electron Microscopy for Materials Science*. 2002.
- [233] M. E. M. Vieira, M. L. S. e Silva, L. F. C. de Oliveira, Í. T. Perrone, and R. Stephani, “Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV): fundamentos e aplicações em produtos lácteos,” *Res. Soc. Dev.*, vol. 10, no. 10, p. e262101018622, 2021.
- [234] B. J. Inkson, *Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization*. Elsevier Ltd, 2016.
- [235] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, “Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM),” *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.*, pp. 1–40, 2007.
- [236] J. W. Lichtman and J. A. Conchello, “Fluorescence microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 910–919, 2005.
- [237] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, and M. D. Bootman, “Fluorescence microscopy,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2014, no. 10, pp. 1042–1065, 2014.
- [238] F. W. D. Rost, *Quantitative Fluorescence Microscopy*. Sydney: University of New South Wales, 1991.
- [239] U. Kubitscheck, Ed., *Fluorescence Microscopy*. Wiley, 2013.
- [240] J. B. Sanderson, “Phase Contrast Microscopy,” in *eLS*, Wiley, 2001.
- [241] B. Celular, *BIO Celular 1*, vol. 1, no. 2.
- [242] W. L. E. Magalhães, E. L. Thá, and D. M. Leme, “Comunicado Técnico 427 - Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA,” *EMBRAPA*. no. Dezembro, p. 10, 2018.
- [243] P. C. Liao, S. Franco-Iborra, Y. Yang, and L. A. Pon, *Live cell imaging of mitochondrial redox state in mammalian cells and yeast*, 1st ed., vol. 155. Elsevier Inc., 2020.
- [244] F. R. M. Laurindo, D. C. Fernandes, and C. X. C. Santos, “Chapter 13 Assessment of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation Products,” *Methods Enzymol.*, vol. 441, no. 08, pp. 237–260, 2008.
- [245] F. R. M. Laurindo, D. C. Fernandes, and C. X. C. Santos, “Assessment of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation Products,” 2008, pp. 237–260.
- [246] L. Váradi, M. Breedon, F. F. Chen, A. Trinchi, I. S. Cole, and G. Wei, “Evaluation of novel Griess-reagent candidates for nitrite sensing in aqueous media identified via molecular fingerprint searching,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 7, pp. 3994–4000, 2019.